

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Veränderungen im LPS-Muster von *E. coli* Shigella  
durch *cld*<sub>pHS-2</sub>**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Bastian Schmidt

aus Salzgitter

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. Th. Adam  
2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Brunner-Weinzierl  
3. Priv.-Doz. Dr. B. Panzig

Datum der Promotion: 28.03.2006

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	5
1 EINFÜHRUNG.....	7
1.1 TAXONOMIE VON SHIGELLEN UND PATHOGENESE DER SHIGELLOSE .....	7
1.2 REAKTIVE ARTHRITIS ALS SPÄTKOMPLIKATION DER SHIGELLOSE .....	11
1.3 LIPOPOLYSACCHARIDE BEI ENTEROBACTERIACEAE.....	13
1.4 DER AUFBAU VON O-SEITENKETTEN .....	14
1.5 SEROSPEZIFITÄT DURCH OLIGOSACCHARIDEINHEITEN .....	19
1.6 DAS <i>CLD</i> -GEN IN VERSCHIEDENEN ENTEROBACTERIACEAE .....	23
1.7 VERMUTLICHER KOMPLEX MEHRERER PROTEINE REGULIERT DIE LPS-SYNTHESE.....	27
1.8 ERSTBESCHREIBUNG EINES <i>CLD</i> <sub>PHS-2</sub> -GENS AUF DEM PHS-2-PLASMID VON <i>E. COLI</i> FLEXNERI .....	29
1.9 AUSWIRKUNGEN VON <i>CLD</i> UND <i>CLD</i> <sub>PHS-2</sub> AUF VIRULENZ, INVASION UND SERUMRESISTENZ .....	32
1.10 FRAGESTELLUNG .....	33
2 MATERIAL UND METHODEN .....	35
2.1 BAKTERIENSTÄMME .....	35
2.2 GERÄTE .....	35
2.3 CHEMIKALIEN .....	36
2.4 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.....	39
2.5 BAKTERIOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	41
2.5.1 <i>Bakteriologische Methoden</i> .....	41
2.5.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien mit CaCl <sub>2</sub> .....	41
2.5.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien mit RbCl.....	42
2.5.1.3 Transformation und Isolierung kompetenter Bakterien .....	43
2.5.1.4 Minimale Hemmkonzentration (MHK) für einen Bakterienstamm (Resistenzprüfung).....	45
2.5.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	46
ARBEITEN MIT DNA – ALLGEMEINE METHODEN .....	46
2.5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA .....	46
2.5.2.2 Aufreinigung von DNA über Phenol/Chloroform-Extraktion .....	48
2.5.2.3 Ethanolpräzipitation von DNA .....	49
2.5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	49
2.5.2.5 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten.....	50
2.5.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Mobicol (Mo Bi Tec) .....	51
2.5.2.7 Hybridisierung zweier Oligonukleotide.....	52
ARBEITEN MIT DNA – ENZYMATISCHE METHODEN .....	53
2.5.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	53
2.5.2.9 Phosphorylierung der doppelsträngigen DNA .....	54
2.5.2.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	55
2.5.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten .....	56
2.5.2.12 Durchführung einer PCR.....	57
2.5.2.13 DNA-Sequenzierung .....	58
ARBEITEN MIT PROTEINEN.....	62
2.5.2.14 Herstellung von Proteinen .....	62
2.5.2.15 Messung von Proteinen .....	64
2.5.2.16 Gelelektrophorese für Proteine.....	65
2.5.2.17 Western Blot .....	67
2.5.2.18 Proteindarstellung auf einer Membran mittels Antikörper (Western Blot).....	68
ARBEITEN MIT LIPOPOLYSACCHARIDEN (LPS).....	70
2.5.2.19 Herstellung von Lipopolysacchariden .....	70
2.5.2.20 Gelelektrophorese nach Laemmli.....	72
2.5.2.21 Darstellung von LPS mittels Silberfärbung.....	73
2.6 COMPUTERPROGRAMME .....	75
3 ERGEBNISSE .....	76
3.1 ARBEITEN MIT „OUT OF FRAME“-KONSTRUKTEN.....	78
3.1.1 <i>pBlue-cld</i> <sub>PHS-2-out</sub> und <i>pUC19-cld</i> <sub>PHS-2-out</sub> .....	78
3.1.1.1 Erstellung der Konstrukte .....	78
3.1.1.2 Transformation in <i>E. coli</i> Flexneri (SF).....	81
3.1.1.3 Expression von <i>cl</i> <sub>PHS-2</sub> .....	84
3.1.2 <i>pGEX-cld</i> <sub>PHS-2-out</sub> und <i>pBR322-cld</i> <sub>PHS-2-out</sub> .....	87

3.1.3	<i>pUC19-cld<sub>pHS-2</sub>+27 und pUC19-cld<sub>pHS-2</sub>+263</i> .....	91
3.1.3.1	Erstellung der Konstrukte und Transformation in <i>E. coli</i> Flexneri .....	91
3.1.3.2	Expression von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> .....	95
3.2	ARBEITEN MIT „IN FRAME“-KONSTRUKTEN .....	99
3.2.1	<i>pGEX-cld<sub>pHS-2</sub>-in</i> .....	100
3.2.1.1	Erstellung des Konstrukts und Transformation in SF .....	100
3.2.1.2	Expression von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> .....	102
3.3	ÜBERSICHT DER EXPRESSIONSANALYSEN.....	104
3.4	DARSTELLUNG VON LIPOPOLYSACCHARIDEN (LPS).....	105
3.4.1	<i>Vergleich der LPS-Muster verschiedener SF Serogruppen</i> .....	105
3.4.2	<i>Auswirkung von cld<sub>pHS-2</sub> auf das LPS-Muster von SF Serogruppe 6</i> .....	106
4	DISKUSSION .....	108
4.1	DISKUSSION DER METHODEN.....	108
4.1.1	<i>Transformationsmethodik</i> .....	108
4.1.2	<i>Auswahl der Vektoren</i> .....	110
4.1.3	<i>Immundetektion von cld<sub>pHS-2</sub> durch Antikörper</i> .....	112
4.1.4	<i>Arbeiten mit Lipopolysacchariden</i> .....	114
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	115
4.2.1	<i>Ampicillin-Resistenz von SF-Wildtypen</i> .....	115
4.2.2	<i>Phylognese der Shigella-Klone</i> .....	116
4.2.3	<i>Expression von cld<sub>pHS-2</sub>-Konstrukten</i> .....	119
4.2.3.1	Expression von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> unter Verwendung vektoreigener Promotoren .....	119
4.2.3.2	Expression von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> unter Verwendung des natürlichen <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -Promotors .....	121
4.2.3.3	Lokalisation des natürlichen <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -Promotors.....	124
4.2.3.4	Expression von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> als Fusionsprotein GST-Cld <sub>pHS-2</sub> .....	125
4.2.4	<i>cld<sub>pHS-2</sub> modifiziert SF-Phänotypen</i> .....	126
4.2.4.1	<i>cld</i> und <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> modifizieren LPS-Muster bei SF .....	126
4.2.4.2	Einfluss der O-Seitenketten (LPS) auf die Virulenz von SF .....	127
4.2.4.3	SF Serogruppe 6-Mutante modifiziert LPS-Muster .....	129
4.2.5	<i>Ausblick</i> .....	131
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	134
	LITERATURVERZEICHNIS .....	135
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	147
	GRAPHISCHES VERZEICHNIS .....	147
	HINWEISTEXTE .....	147
	TABELLARISCHES VERZEICHNIS .....	148
	DANKSAGUNG .....	149
	LEBENS LAUF .....	150
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	151



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampère
a. bidest.	destilliertes Wasser (steril)
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	zirka
<i>cld</i>	<i>chain length determinant</i> (Gen bzw. Protein)
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Dithio-Bissuccinimidylpropionat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Endkonzentr.	Endkonzentration
ff.	folgende
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
I	Stromstärke
k	kilo
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (mol/l)
m	milli oder Meter
μ	mikro (zum Beispiel μl = mikroliter)
min	Minute
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MW	Molekulargewicht
n	nano
NDP	Nukleosiddiphosphat
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
orf	Replikationsursprung
p	pico
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	Widerstand
R-LPS	raues Lipopolysaccharid
RBS	Ribosombindungsstelle
ReA	Reaktive Arthritis
S./s.	Seite/siehe
S	Stamm
S-LPS	glattes Lipopolysaccharid
SB	<i>E. coli</i> <i>Boydii</i> ( <i>Shigella boydii</i> )
SD	<i>E. coli</i> <i>Dysenteriae</i> ( <i>Shigella dysenteriae</i> )
sec	Sekunde
SF	<i>E. coli</i> <i>Flexneri</i> ( <i>Shigella flexneri</i> )
Ss.	Seiten

Abkürzung	Bedeutung
SS	<i>E. coli</i> Sonnei (Shigella sonnei)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TLR4	<i>toll like receptor 4</i>
TM	transmembranöse Domäne
Tm	Schmelztemperatur
U	Einheiten oder Umdrehungen (Zentrifuge) oder elektrische Spannung
u.a.	unter anderem
und-PP	Undecaprenol-Pyrophosphoryl
und-PP-GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin-Undecaprenol-Pyrophosphoryl
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen, 1 % = 1 g pro 100 ml)
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einführung

## 1.1 Taxonomie von Shigellen und Pathogenese der Shigellose

Shigellen sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien; sie sind unbegeißelt und unbeweglich. Shigellen gehören zur Familie der Enterobacteriaceae (159, 160). Historisch wurde die Spezies „Shigella“ nach ihrer Erstbeschreibung 1898 durch K. Shiga (168) aufgrund der durch sie verursachten bakteriellen Dysenterie *Bacillus dysentericus* genannt (168, 203) und zeigte einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *Bacillus* (heute *Escherichia*) *coli*. Aufgrund ihrer Unbeweglichkeit und einiger biochemischer Charakteristika wie die Unfähigkeit, Laktose zu fermentieren oder Xylose zu spalten, wurden Shigellen lange Zeit von *E. coli* unterschieden (149, 37). Reeves, Pupo et al. erkannten bei Sequenzvergleichen von acht "housekeeping"-Genen lokalisiert auf vier chromosomalen Regionen eine hohe Homologie der Shigellen zu acht repräsentativen *E. coli* ECOR Stämmen (142). Daraufhin wurde im Jahr 2000 eine neue Nomenklatur eingerichtet, die inzwischen allgemein anerkannt ist und der wir auch in dieser Arbeit folgen. "Housekeeping"-Gene beeinflussen essentielle und vitale Stoffwechselwege des Bakteriums und unterliegen somit einem hohen Selektionsdruck. Daher geben Sequenzen dieser Gene Hinweise für die phylogenetische Einteilung, auf die sich die neue Nomenklatur stützt. Bei dieser werden die 46 Serotypen (Serogruppen) der Subspezies Shigella in drei „Cluster“ und fünf zusätzliche Klone der Spezies *Escherichia coli* untergliedert (Einteilung: Siehe Grafik 7, Seite 34).

Angesichts unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften (z.B. die Unfähigkeit von *Shigella dysenteriae*, Mannitol zu verarbeiten) wurden die Shigellen 1949 nach der Erstbeschreibung von „Shigella boydii“ durch W.H. Ewing (149) in vier Subgruppen unterteilt: *E. coli* (Shigella) *Dysenteriae*, *Flexneri*, *Boydii* und *Sonnei*. Innerhalb der vier Subgruppen werden die Shigellen-Stämme 46 Serogruppen zugeordnet, die sich durch eine spezifische

Reaktion verschiedener Antiseren gegen O-Seitenketten von Lipopolysacchariden unterscheiden. So werden bei *E. coli* Dysenteriae 13 Serogruppen, bei *E. coli* Flexneri 14 Serogruppen und bei *E. coli* Boydii 18 Serogruppen unterschieden, während *E. coli* Sonnei serologisch homogen ist.

Shigellen verursachen im Dickdarm des Menschen eine entzündliche Erkrankung, die aufgrund ihrer Symptomatik als bakterielle Ruhr (Shigellose) bezeichnet wird. Nach einer Inkubationszeit von 1 – 3 Tagen manifestiert sich die Krankheit mit blutigen, schleimigen Durchfällen, abdominellen Krämpfen, Tenesmen und Fieber (86). Komplikationen wie das hämolytisch-urämische Syndrom, epileptische Krämpfe, Sepsis und das toxische Megacolon sind besonders nach Infektionen mit *E. coli* Dysenteriae Typ 1 gefürchtet (200). Die Shigellose heilt normalerweise nach 1 – 2 Wochen aus, eine fünftägige antibiotische Behandlung mit Ciprofloxacin oder Cotrimoxazol empfiehlt die WHO nur bei komplizierten Fällen oder bei besonders gefährdeten Patienten, wie z.B. Kleinkinder (200). Ampicillin hat aufgrund der breiten Resistenzentwicklung der Bakterien an Wirkung eingebüßt (51). Eine Reaktive Arthritis, in schweren Fällen auch ein Reiter-Syndrom, können eine Woche bis mehrere Monate nach den ersten klinischen Symptomen als postinfektiöse Komplikation auftreten. Ansteckungsgefahr besteht vor allem in den ersten Tagen nach Auftreten der Klinik bis maximal 6 Wochen nach der Gesundung. Die Übertragung der Bakterien erfolgt fäkal-oral zumeist durch Schmierinfektion oder über kontaminierte Lebensmittel, wobei in industrialisierten Ländern die Anzahl sexuell übertragener Shigellosen bei homosexuellen Männern in den letzten Jahren stark angestiegen ist (146). Die äußerst geringe Infektionsdosis von 10 – 100 virulenten Bakterien (36), die für eine Manifestation der Ruhr ausreicht, ist unter anderem auf eine relative Säureresistenz zurückzuführen (194), so dass nur eine geringe Reduktion der Keime während der Magenpassage auftritt.

Die durch Shigellen verschuldete bakterielle Dysenterie zeigt vor allem in tropischen und subtropischen Entwicklungsländern eine große endemische Verbreitung. Man geht von jährlich

weltweit geschätzten 600.000 Todesopfern der Infektion aus (200), unter denen sich viele Kinder aus medizinisch unterversorgten Ländern befinden. In Mitteleuropa ist *Shigella* eher selten ein auslösendes Agens für Durchfallerkrankungen. In Deutschland, wo Verdacht, Erkrankung und Tod meldepflichtig sind, wurden im Jahr 2001 nur 1605 Fälle gezählt (147). *E. coli* Dysenteriae (abgekürzt SD), das als einziger Produzent des Shiga-Toxins auch Epidemien auslösen kann (44), und *E. coli* Flexneri (abgekürzt SF), das in Afrika und Südamerika das häufigste Pathogen der bakteriellen Ruhr darstellt (114), gelten als virulenteste Vertreter ihrer Subspezies. *E. coli* Sonnei (abgekürzt SS) verursacht in Mitteleuropa und Nordamerika die meisten der insgesamt wenigen Dysenterien, die aufgrund einer geringeren Virulenz einen meist blanden Verlauf nehmen (17). *E. coli* Boydii (abgekürzt SB) ist bei uns von geringer Bedeutung.

Der Mensch gilt als einziger natürlicher Wirt der *Shigella*, wobei eine Infektion von Primaten in der Literatur erwähnt wird (2, 180). Histopathologisch erzeugt die Kolitis an der Darmschleimhaut des Menschen (100, 101) und von Tieren (156, 180) Nekrosen und Ulcera, an deren Wundgrund sich neutrophile Granulozyten, Erythrozyten, Shigellen und Fibrin befinden und die von einem hämorrhagischen Exsudat bedeckt sind.

Pathogene Shigellen, die zur Zellinvasion fähig sind (85), dringen im Kolon in sogenannte M-(Microfold)-Zellen ein (128, 156), die apikal gefaltete immunologisch aktive Zellen innerhalb der Darmmucosa darstellen und zum mucosa associated lymphatic tissue (MALT) gehören. Shigellen wandern so unbeschadet durch die Zellen (116), werden von Makrophagen phagozytiert und gelangen nach einer bakteriell induzierten Apoptose der Makrophagen in den basolateralen Interzellularraum des Epithels. Ausgehend vom Extrazellularraum infizieren die Bakterien über den basolateralen Pol Kolonozyten, wozu sie vom Darmlumen aus nicht fähig sind (113). Makrophagen setzen nach einer Phagozytose von Bakterien im Interzellularraum Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1 frei (156, 205). Die Entzündungsmediatoren locken weitere Leukozyten an (Chemotaxis), die durch die epithelialen Schlussleisten der Darmmucosa

wandern. So wird den Shigellen über eine Öffnung des Epithelzellverbandes ein zweiter Weg zum basolateralen Pol der Kolonozyten ermöglicht (127). Experimentell konnte bei einer Unterbindung der Interleukin 1-Wirkung, bzw. der Leukozytenmigration eine Verminderung von Zellinvasion und -schäden durch *Shigella* festgestellt werden (128, 157).

Während der Invasion der Bakterien in die Epithelzelle wird auf beiden Seiten eine Expression unterschiedlicher Proteine induziert. In Shigellen werden Gene der *ipa*-, *mxi*- und *spa*-Operons transkribiert und translatiert (106, 193). Die Operons befinden sich auf einem 31 kb langen Abschnitt eines für die Invasion essentiellen 220 kb-Virulenzplasmides (105, 161, 164). Die Proteine IpaA, IpaB, IpaC und IpaD werden von Mxi und Spa in den Extrazellularraum sezerniert. Während IpaB, IpaC und IpaD für die Invasion der Bakterien in Kolonozyten und Auflösen der von den Wirtszellen gebildeten Phagosomenmembran notwendig sind, erhöht IpaA die Invasionseffizienz (10, 60, 105, 182). Auf zellulärer Ebene ordnen sich die vermehrt produzierten F-Aktinfilamente in den Membranprotrusionen von kultivierten HeLa-Zellen an, die mit einer blütenkelchartigen Struktur die Bakterien umgeben, um sie zu internalisieren (3, 27). Danach lysieren die Shigellen die Phagosomen und vermehren sich intrazellulär mit einer Generationszeit von 40 Minuten (164).

Nach der Invasion der Bakterien gelingt es den Erregern, sich interzellulär auszubreiten und Nachbarzellen über Membranprotrusionen direkt zu infizieren (163). Als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor wird das bakterielle Protein IcsA (lokalisiert auf der äußeren Membran) betrachtet. IcsA induziert über eine Aktinpolymerisation an einem Bakterienpol eine intrazelluläre Bewegung des Bakteriums, nachdem es an einem bakteriellen Pol in die äußere Membran eingebaut wurde (16, 190). Bei experimentell konstruierten IcsA-Mutanten konnte eine interzelluläre Bewegung nicht beobachtet werden, bei Tiermodellen mit Makaken verursachten sie nur milde Dysenterien (158). IcsB dagegen ist essentiell für die Lyse der Protrusion während des interzellulären Transfers (6). Für die Ausbreitung von Zelle zu Zelle

bedarf es der Expression von Cadherin sowie der Aktivierung der Myosin light chain kinase (MLCK) (163).

## 1.2 Reaktive Arthritis als Spätkomplikation der Shigellose

Eine Woche bis mehrere Monate nach Auftreten verschiedener bakterieller Infektionen kann bei einigen Patienten eine Reaktive Arthritis (ReA) beobachtet werden. ReA ist eine Komplikation von Erkrankungen meist verursacht durch *Yersinia*, *Chlamydia*, *Salmonella* oder *Shigella* (41, 117, 170, 172). Neben der Gelenksentzündung gehören eine Konjunktivitis, Urethritis, Balanitis und Keratodermatitis zu einem postinfektiösen Symptomenkomplex, der unter dem Namen Reiter-Syndrom bekannt ist. Bakterielle Bestandteile, die Hinweise auf eine zugrunde liegende Infektion geben, konnten in Synovialflüssigkeiten der im Rahmen einer Reaktiven Arthritis befallenen Gelenke isoliert werden. Es wurden spezifische Antigene (65), DNA (19), mRNA (45) und rRNA (57) nach *Chlamydia*-Infektionen gefunden. Bei Patienten, die nach einer bakteriellen Dysenterie unter einer ReA litten, konnte in der Synovialflüssigkeit Lipopolysaccharid (50) von Shigellen nachgewiesen werden. DNA wurde hingegen nicht gefunden (20).

Daten von Reaktiven Arthritiden nach Shigellosen wurden insbesondere nach Epidemien mit *E. coli* Flexneri (SF) als häufigstem Verursacher dieser Komplikation veröffentlicht (41, 136, 172, 184, 185, 186). Dabei wurden überwiegend Stämme der Serogruppe 2a isoliert (41, 118, 172, 177); die Serogruppen 1b, 2b und 3a wurden ebenfalls als auslösende Erreger von Reaktiven Arthritiden beschrieben (50, 115, 172). *E. coli* Dysenteriae (SD) Serogruppe 1 ist ebenfalls potentiell arthritogen (103), während die anderen Dysenteriae-Serogruppen, sowie *E. coli* Boydii (SB) nicht im Zusammenhang mit der Gelenksentzündung zu stehen scheinen. Es gibt nur eine Publikation, bei der eine Relation der Reaktiven Arthritis zu einer Infektion mit *E.*

*coli* Sonnei (SS) bei drei Patienten beschrieben wird (84). In vielen anderen Veröffentlichungen war diese Spätkomplikation nach Epidemien mit SS jedoch nicht nachzuweisen (69, 172, 176, 177, 178).

Stieglitz et al. entdeckten bei den arthritogenen Serogruppen 2a und 1b von SF ein pHS-2-Plasmid, welches drei, bzw. zwei untersuchten nicht-arthritogenen SS- und SB-Stämmen fehlte (177). Adam et al. stellten bei 99 SS-Stämmen das Fehlen von pHS-2 fest, ferner war das Plasmid bei SF (ausgenommen der Serogruppen X, Y, 5 und 6) nachweisbar (4). Die Serogruppe 1 ist der einzige von mehreren untersuchten Serogruppen von SD, der pHS-2 positiv ist (4) und eine Reaktive Arthritis provozieren kann (103). Die Korrelation der Arthritis mit dem pHS-2-Plasmid bei Shigellen wurde nicht nur bei Menschen, sondern auch bei Affen nach experimentellen Infektionen festgestellt (23).

18 offene Leseraster („open reading frames“, orf), die für 18 unterschiedlich große Peptide kodieren könnten, wurden auf dem pHS-2-Plasmid nachgewiesen (177). Zwei der 18 Sequenzen waren Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die kleinere, 66 Basen umfassende Region beinhaltet nach Translation in 22 Aminosäuren ein Pentapeptid, welches homolog zu der hypervariablen Region der  $\alpha$ 1-Domäne von HLA-B27 (Position 71-75) ist (177). Dies ist deshalb von großem Interesse, da der Besitz des Humanen Leukozyten Antigens (HLA) B27 bei Patienten mit dem Ausbruch einer Reaktiven Arthritis positiv korreliert. Über 80% der Shigella-induzierten ReA sind mit HLA-B27 assoziiert (22). Eine Theorie für die Korrelation wäre eine autoantigene Funktion des Pentapeptids in der Synovia (178), jedoch konnte eine Translation und Expression dieses Proteins bisher nicht nachgewiesen werden. Das andere relevante orf kodiert für ein 35 kD großes Protein, das von Stevenson et al. als plasmideigene „Determinante für die Länge der O-Seitenketten“ („chain length determinant“ von pHS-2, Cld<sub>pHS-2</sub>) von Lipopolysacchariden identifiziert wurde (174). Stevenson sieht in Cld<sub>pHS-2</sub> aufgrund seines Einflusses auf die Immunantwort und der positiven Korrelation zwischen pHS-2 und der ReA



einen potentiell induzierenden Faktor für die ReA (174). Weitere Erkenntnisse über die klinische Relevanz der chromosomal kodierten (Cld) und Plasmid-kodierten (Cld<sub>pHS-2</sub>) „chain length determinants“ werden in Kapitel 1.6 (S. 23) behandelt.

### 1.3 Lipopolysaccharide bei Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae wie *E. coli* besitzen als gramnegative Bakterien eine innere Zytoplasmamembran, eine mureinhaltige Zellwand und eine äußere Membran. Zwischen beiden Letzteren befindet sich der periplasmatische Raum. Einige Bakterien besitzen zusätzlich noch eine äußere polysaccharidreiche Kapsel. Die äußere Membran besteht aus einer Phospholipiddoppelmembran, Lipoproteinen und Lipopolysaccharid (LPS). LPS ist aus drei Bestandteilen aufgebaut: Lipid A, ein Oligosaccharidkern und ein O-Antigen.

Lipid A besteht aus auf Glucosamin basierenden Phospholipiden. Es ist als hydrophobe Komponente des LPS in der äußeren Membran verankert und induziert als Endotoxin eine starke inflammatorische Reaktion beim Menschen (90). Die Immunantwort wird durch die Bindung von Lipid A an TLR4 (toll like receptor 4) ausgelöst (62, 132). TLR4 ist ein Membranprotein, das auf Makrophagen und Endothelzellen vorkommt und eine entfernte Verwandtschaft mit dem Interleukin 1-Rezeptor besitzt (5, 104). Eine proinflammatorische Wirkung konnte für die Acyl-oxyacyl-Bindung von Fettsäuren (genetisch determiniert durch *msbB*) bei der Synthese von Lipid A gezeigt werden (104). *MsbB*-Mutanten erzeugten bei *Escherichia coli* eine deutliche Abschwächung der Immunantwort und eine verminderte Produktion von TNF- $\alpha$  in der Wirtszelle.

Die Verbindung zwischen dem Lipid A und dem O-Antigen wird durch einen Oligosaccharidkern hergestellt, der aus einer inneren und äußeren Kernregion besteht. Bei Enterobacteriaceae zeigt die innere Region einen einheitlichen Aufbau, während der äußere Teil

variiert und in fünf Typen eingeteilt werden kann: R1, R2, R3, R4 und K-12 (59, 197). Verantwortlich für diese Unterschiede sind chromosomal kodierte Waa - (Synonym: Rfa) - Transferasen.

Ein Lipid A-core ist ein Molekül, das aus einem Lipid A und einem Oligosaccharidkern besteht und als Akzeptor für mehrere unabhängig synthetisierte O-Seitenketten fungiert. So kann ein Lipid A-core eine konventionelle O-Seitenkette (S-LPS) oder ein kapsuläres K-Antigen (Gruppe 1) binden (198). Ein Lipid A-core ohne O-Antigen wird auch als R-LPS bezeichnet. Auf der anderen Seite können einige O-Seitenketten auch ohne Lipid A-core an der äußeren Membran verankert sein (196). Während Lipid A und der Oligosaccharidkern zusammen synthetisiert werden, wird das O-Antigen unabhängig erstellt (139).

#### **1.4 Der Aufbau von O-Seitenketten**

Die O-Seitenkette eines S-LPS von Enterobacteriaceae stellt eine Kette miteinander verbundener, sich wiederholender Oligosaccharideinheiten dar, die in Komposition, Sequenz und Länge variiert. Sie ist aber charakteristisch für die jeweiligen Serotypen. So werden O-Seitenketten, deren Zusammensetzung chromosomal kodiert ist, für die Serotypisierung von Shigellen verwendet (48, 61). Der Einfluss von S-LPS auf Serumresistenz, Invasion in Zellen, intrazelluläre Beweglichkeit (155) und Immunantwort wird weiter unten (Kapitel 1.9, Seite 32ff.) erläutert.

Die Synthese von O-Seitenketten bei Gramnegativen Bakterien beginnt mit aktivierten Sacchariden auf der zytoplasmatischen Seite der inneren Plasmamembran und endet zumeist auf der periplasmatischen Seite mit einer Ligation der Seitenkette an den separat synthetisierten Lipid A-core. Es gibt mehrere Varianten der Synthese von Seitenketten, die sich im Ort der Polymerisation und im Transfer durch die Plasmamembran unterscheiden. Es wurden drei Wege

der Polymerisationsreaktion gefunden: Ein Wzy-abhängiger Weg und zwei Wzy-unabhängige Synthesen (Grafik 1, S. 16).

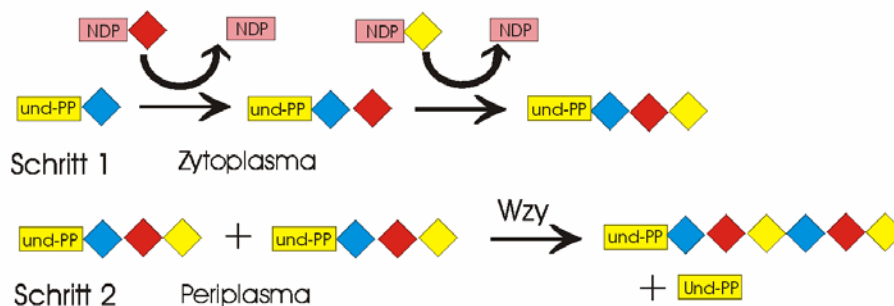
Bei einigen *E. coli* wird bei dem klassischen Wzy-abhängigen Weg das Enzym WecA für den initiiierenden Schritt der Primerbildung (z.B. und-PP-GlcNAc) oder für einen Transfer von N-Acetylglucosamin benötigt (195). Danach verlängern Glycosyltransferasen (Wbg, siehe Tabelle 1, Seite 18) Oligosaccharidketten, die jeweils an einen Undecaprenol-Pyrophosphoryl-Primer (und-PP) gebunden sind. Dabei werden an NDP gebundene Zuckermoleküle auf das Lipid und-PP übertragen, während die Nukleotiddiphosphate abgespalten werden. Es wird angenommen, dass und-PP in der zytoplasmatischen Membran verankert ist (62). Die so gebildeten Oligosaccharid-Einheiten (repeat units) gelangen mit Hilfe einer membranös fixierten Transferase ("Flippase") Wzx (Synonym: Rfbx) in den periplasmatischen Raum (93). Mit Hilfe der Polymerase Wzy (Synonym: Rfc) werden dort mehrere solcher Heteropolymere unter Abspaltung von und-PP verbunden. Dabei macht sich das Protein den elektrochemischen transmembranösen Gradienten als Energiequelle zunutze (29). Neben weiteren Genen, die zu einer zusätzlichen Modifizierung des O-Antigens beitragen (z.B. *rfb*-Region, siehe Grafik 2, Seite 17), wird *wzy*, das für eine Polymerase kodiert, für die Produktion der O-Seitenkette in Shigellen und einem Großteil der anderen Enterobacteriaceae benötigt.

Die zwei Wzy-unabhängigen Wege werden ABC-Transporter-abhängige, bzw. Synthase-abhängige Polymerasen genannt. Bei der erstgenannten katalysiert ein WecA-Enzym (Synonym: Rfe) die Erstellung eines und-PP-GlcNAc-Primers, der durch Glycosyltransferasen auf der zytoplasmatischen Seite verlängert wird. Der Transfer in den periplasmatischen Raum wird mit einem ATP binding cassette (ABC)-Transporter (195) gewährleistet. Ein Wzx-Protein wird aufgrund der meist einfachen linearen Struktur der Homopolymere nicht benötigt.

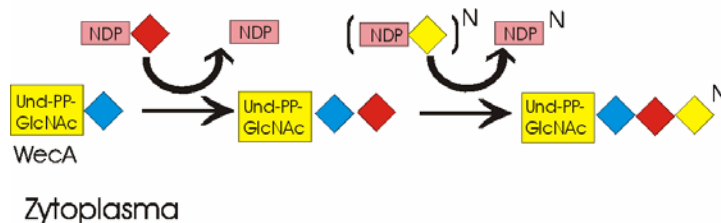
Eine Synthase-abhängige Polymerase wurde bei *Salmonella enterica* Serovar Borreze entdeckt (70). Hier wird ein mittels WecA synthetisierter und-PP-GlcNAc-Primer durch die

Glycosyltransferasen WbbE und WbbF (Synonyme: RfbA und RfbB von *Salmonella enterica*) erweitert. Für den transmembranösen Export sind jedoch weder Wzx noch ABC verantwortlich, eine Beteiligung von WbbF wird diskutiert (196). Aufgrund ihrer vermuteten Aufgabenvielfalt werden WbbE und WbbF Synthasen genannt.

Grafik 1 Polymerisation von O-Seitenketten  
Wzy-abhängige Polymerisation



Wzy-unabhängige Polymerisation



Darstellung von zwei verschiedenen Polymerisationsreaktionen von O-Seitenketten. Oben ist ein Wzy-abhängiger Weg, unten ein Wzy-unabhängiger Weg abgebildet, wobei diese Darstellung für beide Wzy-unabhängigen Reaktionen gilt.

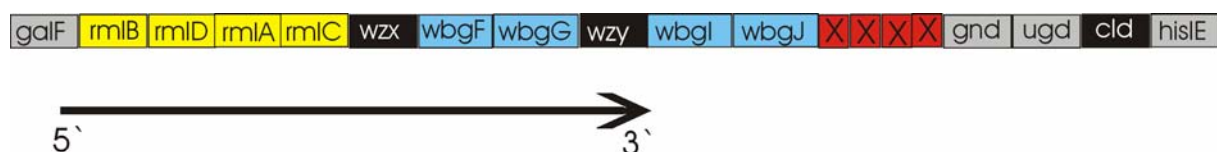
Eine Verankerung der synthetisierten O-Seitenketten am Lipid A-core wird durch eine Ligase gewährleistet, die durch das Gen *waaL* (Synonym: *rfaL*) kodiert ist (95, 165). Bei komplizierteren heteropolymeren Strukturen wird auch hier eine Beteiligung eines zweiten Enzyms WaaK (Synonym: RfaK) diskutiert (196).

Mit Hilfe der verschiedenen Polymerasereaktionen können sich wiederholende Einheiten von Oligosacchariden gebildet werden, die nach enzymatisch katalysierten Transfer- und

Ligasereaktionen als O-Seitenkette des LPS einen spezifischen Aufbau besitzen. Die Zuckerbausteine, aus denen die Oligosaccharideinheiten bestehen, sind ebenso genetisch determiniert wie die Länge der O-Seitenkette. Eine Antigeneinheit enthält je nach Bakterium zwei bis sechs Zuckereinheiten.

Als Bausteine dienen bei Enterobacteriaceen vornehmlich vier modifizierte Monosaccharide: Galactose, Glucose, Mannose, N-Acetyl-Glucosamin und Rhamnose. Die Produktion der Monosaccharide und der Transfer an die Bindungsstelle der Oligosaccharideinheit werden von Enzymen bzw. Genen einer chromosomalen Kasette (*rfb*-Region) koordiniert (171). Bei wenigen Bakterien, wie zum Beispiel bei *E. coli* Sonnei (SS), sind die Gene auf einem Plasmid zu finden (73). Diese Region ist bei vielen Enterobacteriaceae ähnlich organisiert, *E. coli* Flexneri (SF) und *Salmonella enterica* weisen hier zum Beispiel große Gemeinsamkeiten auf (137). Innerhalb dieser Kasette findet man die meisten der für die LPS-Synthese notwendigen Gene. So stehen bei SF die Sequenzen von *rml*-Genen, welche dTDP-Rhamnose synthetisieren, weiter stromaufwärts als andere Gene (Grafik 2, Seite 17). Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Stämme, die nicht im Besitz einer *rfb*-Region waren (z.B. *E. coli* K-12), nach einer Transformation von *rfb* O-Seitenketten produziert haben (13, 112).

Grafik 2 *rfb*-Region



Genetische Box (*rfb*-Region) der O-Antigen produzierenden Region von *E. coli* Flexneri, modifiziert nach Morona et al. (112) und Bacterial Polysaccharide Gene Database (BPGD).

Reeves, Whitfield et al. sahen sich 1996 veranlasst, bei den Genen der LPS-Synthese eine neue, einheitliche Nomenklatur einzuführen (140), da verschiedene Autoren unterschiedliche Bezeichnungen für Gene gleicher Funktion verwendet hatten (z.B. *cld*, *wzz*, *rol*).

Tabelle 1

Gene der *rfb*-Region

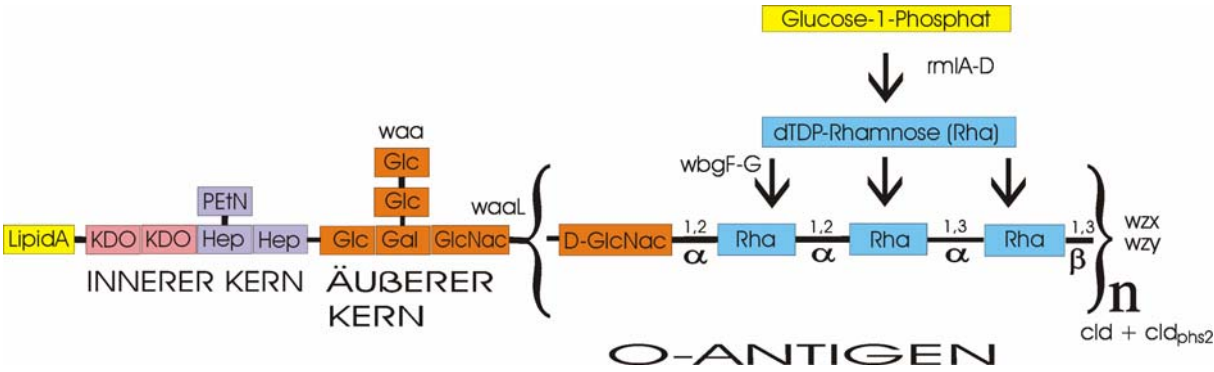
Gen	Synonym	Enzym
<i>galF</i>		D-Galactofuranose
<i>gnd</i>		Gluconat-6-Phosphat Dehydrogenase
<i>hisIE</i>		Histidinbiosynthese
<i>rmlA</i>	<i>rfbC</i>	Glucose-1-Phosphat Thymidyltransferase
<i>rmlB</i>	<i>rfbB</i>	dTDP-D-Glucose 4,6-Dehydratase
<i>rmlC</i>	<i>rfbD</i>	dTDP-4-keto-6-deoxy-D-Glucose-3,5-Epimerase
<i>rmlD</i>	<i>rfbA</i>	dTDP-4-keto-L-Rhamnose Reduktase
<i>ugd</i>	<i>udg</i>	UDP-Glucose 6-Dehydrogenase
<i>X</i>		Unbekannt
<i>wbgF</i>	<i>rfbF</i>	Rhamnosyltransferase
<i>wbgG</i>	<i>rfbG</i>	Rhamnosyltransferase
<i>wbgI</i>	<i>rfbI</i>	O-Antigen biosynthetisches Protein
<i>wbgJ</i>	<i>rfbJ</i>	O-Antigen biosynthetisches Protein
<i>wzx</i>	<i>rfbE</i>	Ligase, Flippase
<i>wzy</i>	<i>rfc</i>	"repeat unit" Polymerase
<i>wzz / cld</i>	<i>rol</i>	chain length determinant

Tabellarische Erläuterung der oben erwähnten Gene. In der linken Spalte steht die neue Nomenklatur von Reeves et al. (140) und der BPGD, in der mittleren Spalte stehen Synonyme anderer Autoren.

Auf der anderen Seite verwirrte, dass Gene gleichen Namens bei unterschiedlichen Zellen diverse Wirkungen hervorgerufen haben. Zum Beispiel kodierte das Gen *rfbD* in *E. coli* K-12 für das Enzym dTDP-4-Dehydrorhamnose-Reduktase, während in *Klebsiella pneumoniae* ein Galactofuranose Produkt von *rfbD* war. Daher wird in dieser Arbeit die neue Nomenklatur verwendet, wobei die anderen Bezeichnungen nicht an Gültigkeit verloren haben. Als einzige Ausnahme wird weiterhin das „chain length determinant“-Gen seiner Funktion entsprechend *cld* statt *wzz* genannt.

Verdeutlicht an dem Beispiel *E. coli* Flexneri Serogruppe Y wird der Zusammenhang der einzelnen Gene aus obiger Kassette in der Entwicklung vom Monosaccharid zur LPS-Kette sichtbar. Mit Hilfe der Gene *rmlA-D* wird Rhamnose gebildet (96), drei Rhamnosen werden miteinander über  $\alpha$ -Glykosidbindungen verknüpft (*wbgF-G*), ehe das an und-PP gebundene N-Acetyl-D-Glucosamin die Oligosaccharidkette des O-Antigens vervollständigt (Grafik 3, Seite 19). Das Oligosaccharid, bestehend aus den vier genannten Monosacchariden, wird mehrfach produziert und - unter Abspaltung von und-PP - durch die Polymerase Wzy miteinander zu einer langen Kette verbunden.

Grafik 3                      Lipopolysaccharidkette von SF Y



Darstellung der Lipopolysaccharidkette von *E. coli* Flexneri Y, aufgeteilt in Lipid A, Oligosaccharidkern und O-Antigen. Dargestellt sind die Struktur, die Zusammensetzung und der Ort der Einwirkung verschiedener Enzyme. Die Grafik wurde modifiziert nach den Vorlagen von Payne et al. (126), Allison et al. (7) und der Bacterial Polysaccharide Gene Database. Gal= Galactose, Glc = Glucose, GlcNac = N-Acetyl-Glucosamin, Hep = L-Glycero-D-Manno-Heptosephosphat, KDO = 2-Keto-3-Deoxyoctonat, PEtN = O-Phosphoryl-Ethanolamin.

**1.5      Serospezifität durch Oligosaccharideinheiten**

Bakterienstämme von *E. coli* Flexneri (SF) werden in 14 verschiedene Serogruppen eingeteilt. Die Einteilung in Serogruppen erfolgt durch unterschiedliche Reaktionen der Bakterien mit spezifischen Antikörpern eines Antiserums. Mit Hilfe des Antiserums können unterschiedliche (sogenannte typ- und gruppenspezifische Antigene) Oberflächenantigene der Bakterien unterschieden werden, wodurch eine präzise Einteilung von *E. coli* Flexneri (SF) in sogenannte Serogruppen ermöglicht wird (siehe Tabelle 2, Seite 19).

Tabelle 2                      Nomenklatur von *E. coli* Flexneri

<i>E. coli</i> Flexneri Serogruppe	1a	1b	2a	2b	3a	3b	3c	4°	4b	5	6 + 6a	X	Y
Serovar (Serotyp)	1	1	2	2	3	3	3	4	4	5	6	X	Y

Nomenklatur der verschiedenen *E. coli* Flexneri Subtypen, modifiziert nach Bergey's manual of determinative bacteriology (149). Die Einteilung von SF-Stämmen erfolgte nach der Identifikation spezifischer Oberflächenantigene.

Typ- oder gruppenspezifische Antigene stellen Oberflächenantigene dar, die durch die unterschiedliche Beschaffenheit der Lipopolysaccharide bestimmt sind. Anhand der spezifischen O-Seitenketten der Bakterien, die von mono- oder polyvalenten Antikörpern aus

monospezifischem Serum erkannt werden, wird eine Differenzierung der SF-Stämme ermöglicht. Die Struktur der O-Seitenketten ist abhängig vom Aufbau der Oligosaccharideinheiten (repeat units). Die Oligosaccharideinheit von SF Serogruppe Y besteht aus vier Zuckern (N-Acetylglucosamin und drei Rhamnosezuckern) und dient als Basis der Tetrasaccharideinheiten von SF Serogruppe X, 1, 2, 3, 4 und 5 (148). Durch Glucosylierung oder Acetylierung der Zucker innerhalb der Tetrasaccharideinheit an unterschiedlichen Positionen wird die Struktur und Antigenität der O-Seitenketten verändert (siehe Grafik 4, Seite 21). Dadurch wird eine spezifische Einteilung der SF-Stämme in Serogruppe 1 bis 5, X und Y möglich.

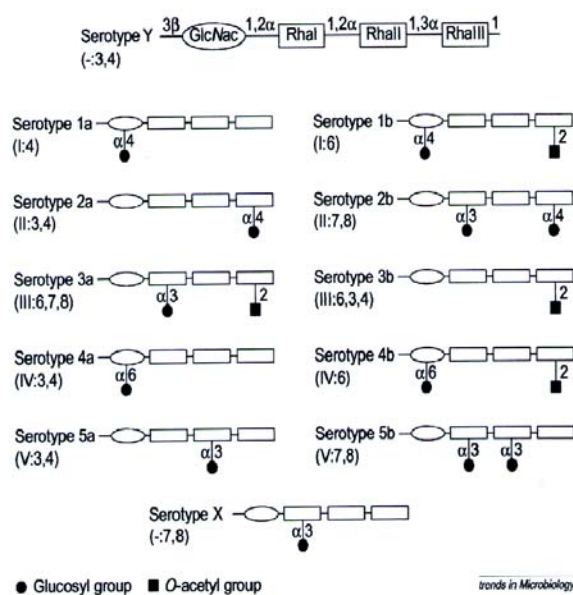
Verschiedene Faktoren haben einen Einfluss auf die unterschiedliche Modifizierung der Oligosaccharideinheiten. Der Einfluss chromosomal kodierter Gene auf die O-Seitenkettenantigenität wurde bereits in Kapitel 1.4 (S. 14) beschrieben. Die Verwandtschaft der Tetrasaccharideinheiten von SF 1 bis 5, X und Y liegt in der großen Ähnlichkeit der jeweiligen *rfb*-Regionen begründet (25). Ausnahmen bilden SF Serogruppen 6 und 6a. Eine unterschiedliche phylogenetische Entwicklung von SF Serogruppen 6 und 6a im Vergleich zu den anderen SF-Serogruppen wurde von mehreren Autoren unter anderem aufgrund des Fehlens bestimmter gruppenspezifischer Antigene postuliert. So sahen Petrovskaya und Bondarenko eine größere Nähe der Serogruppe 6 zu SB als zu SF (114). Die Theorie wird durch phylogenetische Untersuchungen auf der Basis konservierter Gene unterstützt, wonach SF 6 und 6a zu Cluster 1, alle anderen SF-Serotypen aber zu Cluster 3 zugeordnet werden (142).

Neben dem chromosomalen Einfluss auf die Modifikation der Oligosaccharideinheiten wird ein Einfluss lysogener Bakteriophagen auf die Veränderung der Struktur von O-Seitenketten diskutiert (131, 171). In den letzten Jahren wurden fünf verschiedene Serotyp-beeinflussende Phagen isoliert und charakterisiert: SfI, SfII, SfV, Sf6 und SfX (26, 52, 63, 64, 102, 191, 192). Es wird angenommen, dass Phagen nach Integration ihres genetischen Materials



in das bakterielle Genom die Modifikation der Tetrasaccharideinheit von *E. coli* Flexneri Serogruppe Y durch Glucosylierung bzw. Acetylierung bewirkt haben. Während die spezifischen Antigentypen I, II, IV und V und die Antigengruppen 7, 8 das Produkt einer Glucosylierung der Antigengruppen 3, 4 durch die Phagen SfI, SfII, SfV bzw. SfX darstellen, bewirkt eine Acetylierung durch Sf6 eine Konversion in Typ III oder Antigengruppe 6 (148) (siehe Grafik 4, Seite 21). Für die Glucosylierung der O-Antigene werden drei Gene der Phagen benötigt, die oft in der *pro-lac* Region der Shigellen lokalisiert sind (131, 171). Die ersten beiden Gene *gtrA* und *gtrB* sind bei SfI, SfII, SfV und SfX ähnlich und austauschbar (52, 63, 64, 102), das dritte Gen kodiert für eine Serotyp-spezifische Glucosyltransferase (*gtrI*, *gtrII*, *gtrV* oder *gtrX*).

Grafik 4 Tetrasaccharideinheiten von *E. coli* Flexneri

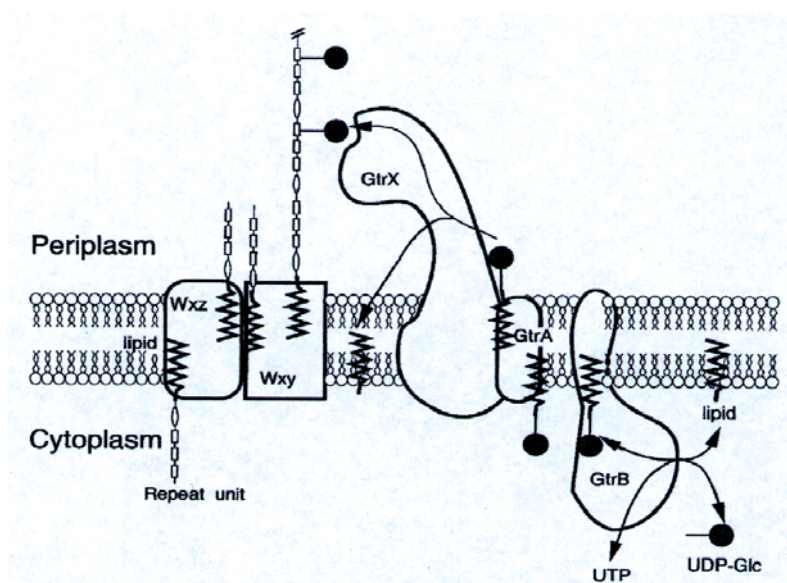


Darstellung der modifizierten Tetrasaccharideinheiten von O-Seitenketten verschiedener *E. coli* Flexneri Serogruppen bzw. Serotypen. Die Basis für Glucosylierung und Acetylierung der repeat units von *E. coli* Flexneri 1, 2, 3, 4, 5 und X bildet das Oligosaccharid von *E. coli* Flexneri Y. Die Art und Lokalisation der Modifizierung ist verantwortlich für die Einteilung in Serogruppen. Aus Allison et al. (7).

Eine Transkription kann sowohl durch eigene Signale wie auch durch Initiation benachbarter Gene gesteuert werden (64, 192). Das 120-Aminosäuren-lange GtrA-Protein scheint mit seinen vier transmembranösen Domänen ein integrales Membranprotein zu sein. Es ist wahrscheinlich, dass GtrA als Flippase die an ein Lipid gebundene Glucose durch die innere Membran in den periplasmatischen Raum transportiert (7). Eine Interaktion mit der Ligase Wzx wird angenommen. GtrB besitzt am Carboxyl-Ende seiner 305 bis 309 Aminosäuren zwei

transmembranöse Regionen, über die das Protein vermutlich in der inneren Membran verankert wird. Das Enzym soll im Zytoplasma die Übertragung der Glucose von undP- (Undecaprenylphosphat)-ss-Glucose auf ein Phospholipid katalysieren (52), ehe die Flippase GtrA aktiviert wird. Das dritte Gen kodiert für ein Enzym, welches größere Unterschiede in Sequenz und Länge (416 bis 506 Aminosäuren) unter den vier Phagen zeigt und jeweils 9 –11 transmembranöse Domänen aufweist. Die Differenz in den Sequenzen ist verantwortlich für die Expression unterschiedlicher Transferasen (z.B. GtrX), die eine charakteristische Glucosylierung eines Zuckers der zuvor polymerisierten O-Seitenkette unter Abspaltung eines Phospholipids ermöglichen (siehe Grafik 5, Seite 22).

Grafik 5 Glucosylierung



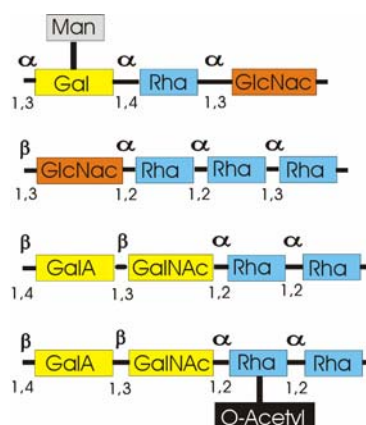
Ein hypothetisches Modell einer Glucosylierung von Zuckern der *E. coli* Flexneri O-Seitenkette am Beispiel von GtrX. Links ist der Transfer und die Polymerisation der Oligosaccharide durch Wxz und Wxy zu sehen. Rechts ist die Übertragung von Glucose auf einen Lipidcarrier, die Flippasereaktion und die Modifikation der O-Seitenkette durch die Gtr-Enzyme dargestellt - aus Guan et al. (52).

Es bleibt anzumerken, dass zwar ein Einfluss von *gtr* auf eine Modifikation der Tetrasaccharide bewiesen ist, die Theorie der genauen Funktion der drei Enzyme stützt sich jedoch auf Sequenzvergleiche, Protein- und Mutationsanalysen. Ein biochemischer Beweis fehlt noch. Für eine Acetylierung der O-Antigene sorgt eine O-Acetyltransferase, die auf dem *oac*-Gen von

Bakteriophage Sf6 kodiert und durch seine neun hydrophoben Regionen innerhalb der 333 Aminosäuren mit der inneren Membran verankert ist (26, 191).

Ein Einfluss von Bakteriophagen wird unter anderem auch bei Virulenzplasmiden postuliert. Phylogenetisch leiten sich wahrscheinlich die Serogruppen X und 1 bis 5 von SF Serogruppe Y ab, was sich auch in der Zugehörigkeit dieser Serogruppen zu Cluster 3 von *E. coli* widerspiegelt. SF Serogruppen 6 und 6a fehlen die Antigene 3 und 4, immunochemisch ähneln die O-Antigene denen von SB (130). Die Untereinheit der O-Seitenkette von SF Serogruppe 6 gleicht sogar - abgesehen von einer Acetylierung - derjenigen von *E. coli* O147 (67) (siehe Grafik 6 und Grafik 7, Seiten 23, 34).

Grafik 6 Vergleich von repeat units



Vergleich von Untereinheiten (repeat units) der O-Seitenketten von vier *E. coli* Stämmen (von oben nach unten):

*E. coli* O75 (39),

*E. coli* Flexneri Serogruppe Y (148),

*E. coli* O147 (67),

*E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (33, 124).

Gal = Galactose, GalA = Galacturonsäure, GalNAc = 2-Acetamido-2-Deoxygalactosyl, Glc Nac = N-Acetyl-D-Glucosamin, Man = Mannose, Rha = Rhamnose

## 1.6 Das *cld*-Gen in verschiedenen Enterobacteriaceae

Wie viele Oligosaccharideinheiten eine O-Seitenkette besitzt, wenn die Polymerisation abgebrochen und die O-Seitenkette mit dem Lipid A-core verknüpft wird, ist abhängig von einem weiteren Gen, dem „chain length determinant“ (*cld*). Jede Spezies erhält dadurch eine charakteristische Längenverteilung der O-Seitenketten entsprechend der Aktivität von Cld-Proteinen. Cld beeinflusst die Kettenlänge von LPS nur bei Wzy-abhängiger Polymerisation (z.B. bei SF) und einer Lipid A-core gebundenen Form des Antigens. Bei einer mittels ABC

transportierten, Wzy-unabhängigen Polymerisation (z.B. bei *Klebsiella pneumoniae* O1 und *E. coli* O9 (21, 71)) zeigt die LPS-Darstellung eine breite Verteilung der Kettenlängen und kein einheitliches Muster (196). Im Genom dieser Bakterien konnte kein *cld*-homologes Gen gefunden werden. Experimentell herbeigeführte Deletionen in der Genkassette, die mit der LPS-Synthese zusammenhängt, ergaben keine Veränderungen im LPS-Muster, sofern noch Seitenketten gebildet wurden (18). Bisher wurde aufgrund von unveröffentlichten Ergebnissen von Amor et al. angenommen, dass Cld keinen Einfluss auf Lipid A-core-ungebundene Antigene habe, da diese keine Veränderungen bei *cld*-Mutanten aufwiesen (196). Barr et al. entdeckten jedoch ein *cld*(ECA)-Gen auf dem chromosomalen Cluster *wec* von *E. coli* K-12, welches die Kettenlänge eines O-Seitenketten-Äquivalents, des „enterobacterial common antigen“-Polysaccharids (ECA), moduliert (9), obwohl ECA nicht an einen Lipid A-core gebunden ist. Allerdings fehlt der Beweis einer Beeinflussung der Anzahl an repeat units von unverankerten O-Seitenketten, die man zum Beispiel bei *E. coli* O111 und O127 (129) finden kann. In manchen Zellen (z.B. *E. coli* O8 und O9) zeigt das *cld*-Gen zwar keine Wirkung auf O-Antigene, aber verändert und kontrolliert die Kettenlänge von kapsulären Antigenen (35, 139).

Ein *cld*-Gen oder vergleichbare Sequenzen wurden bei vielen Enterobacteriaceae neben der jeweiligen *rfb*-Region zwischen den Genen *gnd* und *his* gefunden. *Cld* kodiert für ein Protein, dem „chain length determinant“, welches große Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz unter den verschiedenen Spezies aufweist. In *Shigella* wurde das *cld*-Gen von Macpherson et al. (97) entdeckt, nachdem zuvor in *E. coli* O75, O111, K-12 (12, 14) und in *Salmonella enterica* typhimurium LT2 (11, 13) beschrieben wurde, dass sich innerhalb der jeweiligen *rfb*-Region ein Gen (*rol* bzw. *cld*) befindet, welches die Länge von O-Seitenketten des LPS beeinflusst. Die Länge wird durch die Anzahl der Oligosaccharideinheiten (repeat units) der Lipopolysaccharide determiniert. Diese können mit Hilfe verschiedener Methoden (z.B. Silberfärbung) dargestellt werden, nachdem sie durch ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt

wurden. So durchlaufen Lipid A-core-Verbindungen ohne Seitenkette das Gel am schnellsten und dienen als unterste Bande der Orientierung. Sie sind sowohl bei Zellen, die R-LPS herstellen, als auch bei denen, die S-LPS produzieren, zu sehen. Die verschiedenen Banden darüber entstehen durch O-Seitenketten, die sich am Lipid A-core befinden, und werden bei Bakterien mit S-LPS beobachtet. Je größer die Anzahl der repeat units beim O-Antigen ist, desto langsamer ist die Laufgeschwindigkeit im Gel. Bakterien, die O-Seitenketten produzieren, aber denen ein *cld*-Gen fehlt oder dessen Funktion eingeschränkt ist, besitzen kein charakteristisches LPS-Muster. Die Banden sind gleichmäßig über das ganze Gel verteilt, allerdings sind bei diesen Bakterien die O-Antigene meistens aus mehr als 15 repeat units aufgebaut. Aufgrund seines Einflusses auf die Anzahl der Ketteneinheiten (repeat units) des O-Antigens sorgt *cld* für ein charakteristisches LPS-Muster. Es werden nach Franco et al. drei Typen unterschieden: S-Typ (short), I-Typ (intermediate) und L-Typ (long) (42). Bei dem S-Typ werden vornehmlich Seitenketten mit 7 bis 16 repeat units gebildet, der I-Typ besitzt LPS mit hauptsächlich 10 bis 18 Einheiten und der L-Typ weist meistens 16 bis 25 O-Antigen-Kettenglieder auf. Morona et al. entdeckten bei *cld*-Mutanten in *E. coli* einen vierten LPS-Typen, den VS-Typ (very short), mit 3 bis 8 repeat units (108).

Während *cld* bei SF für ein LPS-Muster des S-Typs (11 – 16 repeat units) sorgt (112), gehört das LPS von *Salmonella typhimurium* mit 19 – 30 O-Einheiten zum L-Typ. Die meisten *Escherichia coli*-Stämme bilden O-Seitenketten vom I-Typ (42), Variationen der LPS sind jedoch in einigen Fällen bei gleichen Bakterienstämmen nicht auszuschließen (1, 24, 53). Wildtypen der Enterobacteriaceae zeigen neben dieser modalen Verteilung mit einer spezifischen Länge der Antigene oft eine bimodale Verteilung der Lipopolysaccharide mit zusätzlichen Banden von 1 bis 5 repeat units. Der Einfluss von *cld*-Genen auf das LPS-Muster wurde in mehreren Experimenten bewiesen. *cld*-Mutanten oder Deletionen bewirkten eine Veränderung der Lipopolysaccharide vom jeweils charakteristischen Muster der

unterschiedlichen Enterobacteriaceae zu einer gleichmäßigeren, weniger regulierten Längenverteilung der O-Seitenketten (55, 112, 126).

Das Protein Cld von SF ist charakterisiert durch zwei transmembranöse Domänen (TM), die aminoterminal (TM1, Aminosäuren 32-52) und carboxyterminal (TM2, Aminosäuren 296-316) lokalisiert sind und für eine Verankerung des Proteins in der inneren Membran sorgen (11). Dazwischen befindet sich eine große zentrale hydrophile Domäne, die sich im periplasmatischen Raum befindet (112). Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen in Proteinanalysen die nahe Verwandtschaft einiger „chain length determinants“ von Enterobacteriaceae nach (siehe Tabelle 3, Seite 27), wobei die größten Gemeinsamkeiten in den jeweiligen beiden transmembranösen Domänen liegen.

Die Cld-Proteine von *E. coli* K-12, *E. coli* Flexneri Y (SF Y) und *E. coli* Dysenteriae 1 besitzen homologe TM1- und TM2-Regionen bei einer Gesamtidentität von 97 – 98 % (55). Die Enzyme unterscheiden sich in nur neun von 325 Aminosäuren, vier von diesen befinden sich in einem hydrophilen Bereich des 36 kD-Proteins, nahe der TM2-Domäne. Die betroffene Region umfasst 32 Aminosäuren und bildet im Periplasma eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur (55, 110). Es wurde vermutet, dass zumindest zwei der vier differierenden Aminosäuren die Wirkung des Cld verändern, da *E. coli* K-12 und *E. coli* Dysenteriae 1 Lipopolysaccharide des I-Typs produzieren, während SF als S-Typ kürzere Seitenketten herstellt.

Nach der Mutation von Lysin in Asparagin an Position 267 bildete Cld von SF Y deutlich längere O-Antigene (108). Doch auch der Austausch verschiedener anderer Aminosäuren veränderte das LPS-Muster. So wurde nur bei Cld-Proteinen, die für eine Verteilung des S-Typs sorgten, an Position 224 Isoleucin gefunden. Nach dem Austausch von 224Valin in 224Isoleucin präsentierten *E. coli*-Stämme, die ursprünglich durch ein LPS-Muster vom I-Typ charakterisiert waren, kürzere O-Seitenketten des S-Typs (42).

Dies lässt erkennen, dass die genaue Wirkung des Enzyms nicht einer speziellen Region zugeordnet werden kann. Funktionelle Determinanten sind über das gesamte Protein verteilt. Dennoch konnte eine Dominanz des Carboxy-terminalen Endes über das Amino-terminale Ende nachgewiesen werden (108). Aus zwei Cld-Enzymen unterschiedlicher Herkunft und Funktion (SF Y und *Salmonella enterica* typhimurium LT2) wurde ein Protein konstruiert, dessen Carboxy-terminale Domäne den weitaus größeren Einfluss auf das LPS-Muster zeigte. Viele Cld-Proteine sind innerhalb der Enterobacteriaceae aufgrund ihrer Ähnlichkeit komplett austauschbar, ohne ihre ursprüngliche Funktion einzubüßen (55, 108, 174).

Tabelle 3

Cld- oder Cld-ähnliche Proteine

Cld-Protein aus Bakterium	% Identität zu dem Cld-Protein von														
	SFY	LT2	EO8	Y08	Yps	Pa05	O111	Sd1	K-12	EO9	O75	pHS2	fepE	otnB	
<i>E. coli</i> SF Y	100	72	88,9	15,7	20,9	20	65,5	~98	~97	88,7	94,5	~24	24,6	18,8	
<i>Salm.ent.</i> LT2		100	71,2	15,6	22,6	19,6	64,6	*	*	*	73,4	*	26,6	22,6	
<i>E. coli</i> O8			100	15,2	15,5	19,3	65,2	*	*	98,5	89,9	*	24,7	15,2	
<i>Yersin.ent.</i> O8				100	37,3	11,5	19,3	*	*	*	*	*	25,1	10,4	
<i>Yersin.pseud.</i>					100	13,2	22,6	*	*	*	*	*	36,1	18,2	
<i>Pseud.aero.</i> 05						100	19,9	*	*	*	*	*	17	18,8	
<i>E. coli</i> O111							100	*	*	64,7	66,6	*	26,9	18,7	
<i>E. coli</i> SD 1								100	~97	*	*	*	*	*	
<i>E. coli</i> K-12									100	*	*	*	*	*	
<i>E. coli</i> O9										100	89,2	*	*	*	
<i>E. coli</i> O75											100	*	*	*	
Cld <sub>pHS-2</sub> (SF2a)												100	63	*	
FepE aus K-12													100	14	
OtnB aus V.ch														100	

Prozentuale Identitäten der Aminosäuren von verschiedenen Cld- oder Cld-ähnlichen Proteinen. SF Y=*E. coli* Flexneri Serotyp Y, LT2=*Salmonella enterica* LT2, EO8=*E. coli* O8, YO8=*Yersinia enterocolica* O8, Yps=*Yersinia pseudotuberculosis*, Pa05=*Pseudomonas aeruginosa* O5, O111=*E. coli* O111, SD1=*E. coli* Dysenteriae Serogruppe 1, K-12=*E. coli* K-12, EO9=*E. coli* O9, O75=*E. coli* O75, pHS2=pHS-2 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 2a, fepE=FepE aus *E. coli* K-12, otnB=OtnB aus *Vibrio cholerae* O139, \*=nicht verglichen. Modifiziert nach den Ergebnissen aus (55, 112, 139, 174).

## 1.7 Vermutlicher Komplex mehrerer Proteine reguliert die LPS-Synthese

Es gibt zwei Modelle, die versuchen, die genaue Funktion von Cld bei der Synthese von Lipopolysacchariden zu erklären. Bastin et al. vermuteten, dass Cld mit Wzy interagiert und als

molekularer Zeitgeber für die Polymerisation fungiert, die so nach einer bestimmten Dauer gestoppt wird (12). Die alternative Hypothese von Morona et al. behauptete eine überbrückende Funktion von Cld, indem es als Chaperon die Interaktion zwischen Wzy und WaaL erleichtert (112). So könne bei einer bestimmten Länge der O-Seitenkette WaaL aktiviert werden und durch eine Ligation mit Lipid A-core die Polymerisation beendet werden. Die Theorie des Einflusses von Cld auf Wzy, das bei diversen *E. coli* (z.B. SF und K-12) mit 11 bis 13 hydrophoben transmembranösen Segmenten in der inneren Membran integriert ist (109, 165, 175, 204), wird durch die gemeinsame Lokalisation wichtiger Bereiche im Periplasma erhärtet. Experimente mit detektierbaren *wzy::phoA*-Fusionen in SF bestätigten die funktionelle Relevanz zweier großer hydrophiler Domänen im periplasmatischen Raum (29). Außerdem bewirkte eine Modifikation des *wzy*-Gens durch den Einbau einer RBS (ribosome binding site) eine erhöhte Expression des Proteins und eine Umwandlung des LPS-Musters von der modalen in eine nicht-modale Form. Die alte Verteilung der Banden von *E. coli* Flexneri-Antigenen wurde mit einer erhöhten Produktion von Cld wiederhergestellt, was das Zusammenwirken von Wzy und Cld nachhaltig bekräftigt (29). Untersuchungen der Expression von kapsulären K-Antigenen Gruppe IB in *E. coli* zeigten eine zusätzliche Beeinflussung der Seitenkettenlänge durch *waaL* (8). Es wird angenommen, dass mehrere Enzyme mit Cld und Wzy einen Proteinkomplex bilden, um die Länge der Antigene zu determinieren. Mit Hilfe einer cross-linking-Reaktion *in vivo*, bei der Proteinkomplexe kovalent verbunden wurden, konnte eine Bildung von Cld-Oligomeren in *E. coli* DH5 $\alpha$  nachgewiesen werden (108). Dabei wurde durch Zugabe von Formaldehyd und DSP (Dithio-Bissuccinimidylpropionat) eine Beschleunigung der Reaktion erreicht. Nach einer Integration von *cld* aus SF in das bakterielle Genom von DH5 $\alpha$  wurde Formaldehyd zu der Kultur gegeben. Anschließend wurden Oligomere von mindestens sechs Cld-Enzymen gefunden, während nach DSP-Zugabe nur Dimere produziert wurden. In den gleichen Experimenten erkannte man die Fähigkeit des Proteins, auch ohne eine Zugabe von Reagenzien Dimere zu



bilden. Als interagierende Bereiche zwischen den Enzymen können sogenannte „coiled coils“ (spiralisierende Spiralen) dienen. Alle Cld-Proteine besitzen Gemeinsamkeiten in der Sekundärstruktur wie  $\alpha$ -helikale Regionen im Periplasma (z.B. Aminosäuren 252-273 nahe der TM2-Domäne von Cld<sub>SF Y</sub> (55)) (11, 125). Innerhalb dieser Regionen wurde mit einer Sequenzanalyse und einem COILS-Programm (94) je nach Protein eine bestimmte Anzahl an „coiled coils“ vorhergesagt (110). „Coiled coils“ sind spiralförmig gewundene Helices eines Peptids, die sich mit Helices anderer Proteine verhaken, wobei 3,5 Aminosäuren für eine Umdrehung benötigt werden (88). Bei Cld-Proteinen, die für ein LPS-Muster des S- oder I-Typs verantwortlich sind, wurde nur eine „coiled-coils“-Region errechnet, während bei L-Typen (1 bis) 2 dieser Regionen gefunden wurden. Bei Cld<sub>pHS-2</sub>, das weiter unten beschrieben wird und Seitenketten mit ca. 90 repeat units produziert, analysierte man drei „coiled-coils“-Bereiche. Insgesamt kann hier ein Zusammenhang der vorhergesagten Anzahl an „coiled-coils“-Regionen mit der Länge der Lipopolysaccharide festgestellt werden (110). Der geringe strukturelle Unterschied bei Cld-Proteinen der S- und I-Typen wird in einem Vergleich ihrer ähnlichen Gensequenzen bestätigt, größere Abweichungen sind nur bei L-Typen zu bemerken (42). Insgesamt bestärken die Erkenntnisse die Theorie, dass die Länge von O-Seitenketten und die Bildung eines charakteristischen LPS-Musters von einem Proteinkomplex mehrerer Enzyme beeinflusst werden.

### 1.8 Erstbeschreibung eines *cld*<sub>pHS-2</sub>-Gens auf dem pHS-2-Plasmid von *E. coli* Flexneri

Stieglitz et al. entdeckten 1989 in fünf Stämmen von SF 2a und 1b ein 3 kb Plasmid pHS-2, das bei drei SS-Stämmen und zwei SB-Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte (177). In größeren Serien wurden 62 enteropathogene Klone von *E. coli* Flexneri (SF) auf pHS-2

untersucht, darunter befanden sich 49 Stämme der Serogruppe 2a. 65% der Bakterien besaßen das Plasmid, kleine Sequenzunterschiede wurden jedoch festgestellt (178). Aufgrund der neuen Sequenzierungsergebnisse wurde in der Gendatenbank die Nukleotidsequenz von pHS-2 um eine Base auf 3049 erweitert. Die Korrektur umfasste eine Insertion von Guanosin an Position 1703 zwischen Thymin und Adenosin (Datenbank: embl:SFRAMC, M25995). Diese Änderung befindet sich am Ende des längsten von 18 möglichen „open reading frames“ (orf), dessen Sequenz von Base 767 bis 1870 reicht und für ein 35 kD-Protein kodiert (177). Dieses Protein und bekannte chromosomal kodierte Cld-Proteine besitzen zwischen 21 und 26 % identische Aminosäuren und einen ähnlichen Aufbau mit zwei hydrophoben transmembranösen Domänen, die sich N- und C-terminal befinden, sowie einer dazwischen liegenden hydrophilen Region, wobei gerade die Sequenzen der hydrophoben Regionen starke Gemeinsamkeiten aufweisen (126, 174). Aufgrund der Strukturhomologien und der ähnlichen funktionellen Eigenschaften mit bekannten chromosomalen Cld-Proteinen wurde das pHS-2-Protein 1995 von Stevenson et al. als Cld<sub>pHS-2</sub> identifiziert (174).

Die Ähnlichkeit der Funktionen der chromosomalen und plasmidkodierten Cld-Enzyme wird im Folgenden erläutert. Es konnte gezeigt werden, dass Cld<sub>pHS-2</sub> auf spezifische Art und Weise die Produktion der O-Seitenketten und die Anzahl der repeat units beeinflusst. Es bewirkt eine Bildung von O-Antigenen mit ca. 90 Oligosaccharideinheiten, wobei das Protein auch in anderen *E. coli*-Stämmen nach dessen Transformation funktionell aktiv ist (126, 174). Das LPS-Muster von SF Serogruppe 2a wird vom chromosomalen Cld sowie vom plasmidkodierten Cld<sub>pHS-2</sub> beeinflusst und zeigt zwei dichtere Bereiche, die von O-Seitenketten mit 8 bis 16 repeat units und mit ca. 90 repeat units gebildet werden. Während das Muster durch die konkurrierenden Determinanten einer insgesamt gleichmäßigeren Längenverteilung der O-Seitenketten (LPS-Muster) entspricht, fokussiert sich das LPS-Muster bei Mutation eines *cld*-Gens umso mehr auf den Bereich, der aus Seitenketten besteht, die noch von dem intakten

Protein beeinflusst werden (174). Das *cld*<sub>pHS-2</sub>-Gen wurde als Ergebnis einer Datenbanksuche mit der Sequenz von *fepE* (Datenbank: X74129), das eine ähnliche Struktur wie die schon bekannten *cld*-Gene besitzt, entdeckt. Die Nukleotidsequenzen von *cld*<sub>pHS-2</sub> und *fepE* weisen eine Identität von 66 % auf (174), die Aminosäureabfolge beider Proteine haben eine Gemeinsamkeit von 63 % (siehe Tabelle 2, Seite 27). Die Funktion von *fepE* in *E. coli* ist nicht geklärt, da es trotz seiner chromosomalen Lokalisation innerhalb des Enterobaktin-Biosynthese- und Transportclusters keine essentielle Rolle im Eisentransportsystem spielt (121, 126). Die erwähnten Homologien von Cld<sub>pHS-2</sub> in Struktur und Funktion mit chromosomalen Cld-Proteinen deuten auf einen ähnlichen Wirkbereich von Cld<sub>pHS-2</sub> mit einer Integration in der inneren Membran und einer möglichen Interaktion mit einem Enzymkomplex hin. Mittels immunochemischer Experimente konnte das Enzym in der zytoplasmatischen Membran nachgewiesen werden (126).

Stromaufwärts von *cld*<sub>pHS-2</sub> am N-Terminus des Gens wurde auf pHS-2 eine 250 Basenpaar lange Sequenz *hmr* entdeckt, die für den stabilen Verbleib des Plasmids im Bakterium verantwortlich ist (144). Adam et al. konnten das pHS-2-Plasmid in den untersuchten SF Serogruppen 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a und 4b nachweisen, wobei es Variabilitäten bei den 3a- und 4a-Stämmen zeigte (4). Den getesteten Stämmen der Serogruppen X, Y und 6 fehlte das Plasmid. Drei untersuchte SB-Stämme der Gruppen 1, 11 und 14, sowie die Serogruppen 2 und 4 von SD waren pHS-2-negativ, während das Plasmid bei SD Serogruppe 1 und SB Serogruppe 16 nachgewiesen wurde.

M. Abba aus der Arbeitsgruppe Adam konnte nach einer Transformation von *cld*<sub>pHS-2</sub> aus dem Stamm *E. coli* Flexneri Serogruppe 2a (S279) eine Expression von *cld*<sub>pHS-2</sub> in *E. coli* DH5α darstellen, wobei die Sequenz des Gens im Vergleich zu dem korrigierten Datenbankeintrag in einer Base verändert war (nicht veröffentlicht). An Position 938 des pHS-2-Plasmids besitzt das *cld*<sub>pHS-2</sub>-Gen von S279 Cytosin statt Thymin. Diese Modifizierung bewirkt nach Translation eine Veränderung der Aminosäure von Prolin in Serin. In den Sequenzanalysen von *cld*<sub>pHS-2</sub> aus S279

(siehe Hinweistext 1, Hinweistext 4, Seiten 81 und 101) dieser Arbeit bestätigte sich die um eine Base veränderte Sequenz.

### 1.9 Auswirkungen von *cld* und *cld<sub>pHS-2</sub>* auf Virulenz, Invasion und Serumresistenz

Mittels Mutationen der *cld*- und *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gene sowie weiterer Gene des *rfb*-Clusters von SF konnten Effekte der jeweiligen Sequenzen auf Virulenz, Invasion und Serumresistenz nachgewiesen werden. Während die primäre Invasion von SF in HeLa-Zellen bei jeglicher Mutation von LPS-beeinflussenden Genen nicht beeinträchtigt ist (120, 189), zeigen chromosomale *cld*-, *waaL*- und *wzy*-Mutanten eine verminderte intrazelluläre Bewegung und interzelluläre Ausbreitung (153, 154). Dies kann mit einer verringerten F-Aktininformation und polaren Lokalisation von IcsA auf der bakteriellen Oberfläche begründet werden, die bei diesen Mutanten in Zellkulturen beobachtet wurden (153, 189). Eine eingeschränkte interzelluläre Ausbreitung, die auch bei manipulierten SF-Stämmen, deren O-Seitenketten-Produktion inhibiert wurde, festzustellen war (119, 120), bewirkt eine reduzierte Virulenz (189). Im Gegensatz zu einer deutlich eingeschränkten Invasivität der *cld*-Mutanten blieb die Invasivität von SF bei *cld<sub>pHS-2</sub>*- und überraschenderweise auch bei *cld-cld<sub>pHS-2</sub>*-Doppel-Mutanten unbeeinflusst (111, 126). In weiteren Untersuchungen zeigten *cld<sub>pHS-2</sub>*- und Doppel-Mutanten eine hohe Serumsensitivität *in vitro* und eine im Vergleich zum Wildtyp mildere und kürzere Keratokonjunktivitis im Serény-Test bei Mäusen (126). Diese Beobachtungen sind mit einer geringeren Virulenz der Mutanten zu erklären. *Cld*-Mutanten zeigten im Vergleich zu *cld<sub>pHS-2</sub>*-Mutanten eine deutlich höhere Serumresistenz, im Serény-Test verursachten allerdings auch diese Stämme mildere Konjunktivitiden (126, 189). Vermutlich sorgt eine reduzierte intra- und interzelluläre Beweglichkeit bei den beiden Mutanten für eine verminderte Virulenz (56). Die Wirkung von *cld<sub>pHS-2</sub>* auf Serumresistenz und Klinik der Keratokonjunktivitis, einem Symptom des Reiter-Syndroms, lässt auf einen Zusammenhang zwischen *cld<sub>pHS-2</sub>* und Reaktiver Arthritis

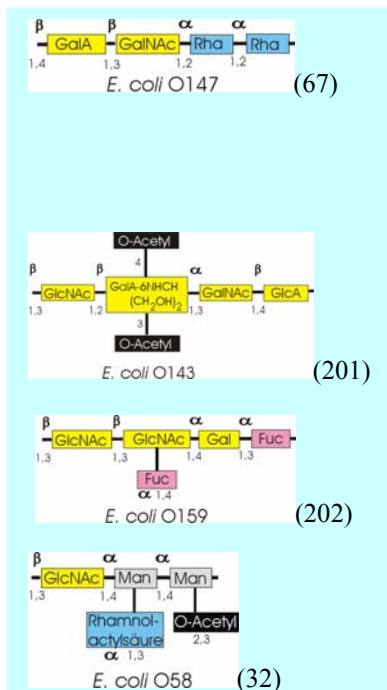
als Spätkomplikation der Shigellose schließen (174), was aber noch zu beweisen ist. Die positive Korrelation zwischen einer pHS-2-Prävalenz bei Shigellen und dem Auftreten der Arthritis nach bakterieller Ruhr wurde in Kapitel 1.2 (Seite 11) beschrieben.

Eine klinische Relevanz der Länge von O-Seitenketten kann nicht nur deshalb vermutet werden, weil längere Lipopolysaccharide bei mehreren *E. coli*-Klonen für eine höhere Serumresistenz sorgen (133), sondern auch weil häufigere und schwerere Dysenterien bei Bakterien wie SF 2a und SD 1 beobachtet wurden, die im Besitz von pHS-2 sind (200). Auf der anderen Seite werden bei der Hälfte der untersuchten Harnwegsinfektionen durch *E. coli* die normalerweise seltenen Stämme isoliert, die kurze O-Seitenketten bilden (LPS-S-Typ) (1). Die meisten analysierten *Escherichia coli*-Stämme, die eine Neugeborenenmeningitis verursacht haben, produzierten ebenfalls kurze Lipopolysaccharide (187, 188). Der genaue Zusammenhang zwischen der Länge der O-Seitenkette und der Virulenz von *E. coli*-Klonen ist noch nicht geklärt.

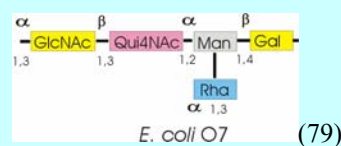
### 1.10 Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob  $cld_{pHS-2}$  eine Veränderung des Phänotyps von SF bewirkt. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob eine Integration von  $cld_{pHS-2}$  in SF Serogruppe 6, die normalerweise nicht im Besitz des Gens ist, Auswirkungen auf das LPS-Muster hat.

Grafik 7

Repeat units von *E. coli*

*Escherichia coli* besitzt 187 Serotypen (Serogruppen), inklusive der 46 Shigella-Serotypen (Serogruppen), die in 3 Cluster und 5 Einzelklone aufgeteilt sind (142).

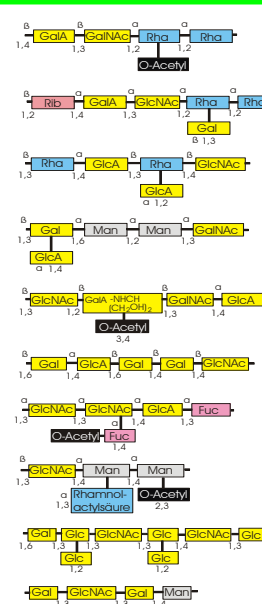


## LEGENDE

- Rhamnose oder Rhamnosederivate
- Glucose, Galaktose oder Derivate
- Ribose
- Mannose oder Derivate
- O-Acetyl
- Fucose

GlcNAc = N-Acetyl-Glucosamin  
 GlcNAc = 2-Acetamido-2-Deoxyglucosyl  
 GlcA = Glucuronsäure  
 GalA-6NHCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> = 2-Amino-1,3-Propanediolglucuronsäure  
 NonNA = 5-Acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-7-(3R-3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulonsäure  
 Qui4NAc = 4-Acetamido-2,6-Dideoxyglucose

## CLUSTER 1:



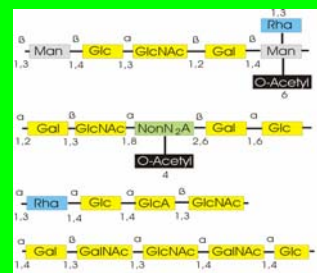
von oben nach unten:

*E. coli* Flexneri Serotyp 6 (124)*E. coli* Boydii Serotyp 2 (74)*E. coli* Boydii Serotyp 4 (143)*E. coli* Boydii Serotyp 6 (31)*E. coli* Boydii Serotyp 8 (81)*E. coli* Boydii Serotyp 14 (75)*E. coli* Dysenteriae Serotyp 4 (34)*E. coli* Dysenteriae Serotyp 5 (150)*E. coli* Dysenteriae Serotyp 7 (46)*E. coli* Dysenteriae Serotyp 9 (122)

Weitere Stämme aus Cluster 1:

*E. coli* Boydii Serotypen 1, 3, 10, 18,*E. coli* Flexneri Serotyp 6A,*E. coli* Dysenteriae Serotypen 3, 6, 11, 12 und 13

## CLUSTER 2:



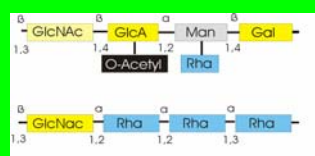
Von oben nach unten:

*E. coli* Boydii Serotyp 5 (80)*E. coli* Boydii Serotyp 7 (78)*E. coli* Boydii Serotyp 9 (77)*E. coli* Dysenteriae Serotyp 2 (92)

Weitere Stämme aus Cluster 2:

*E. coli* Boydii 11, 15, 16 und 17

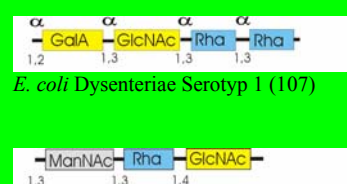
## CLUSTER 3:



Von oben nach unten:

*E. coli* Boydii Serotyp 12 (76)*E. coli* Flexneri Serotyp Y (148)Die repeat units von *E. coli* Flexneri Serotyp 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 5 und X aus Cluster 3 leiten sich von SF Serotyp Y ab.

## 5 EINZELKLONE:

*E. coli* Dysenteriae Serotyp 1 (107)*E. coli* Dysenteriae Serotyp 10 (123)*E. coli* Sonnei (134)

Außerdem:

*E. coli* Dysenteriae 8*E. coli* Boydii 13

## 2 Material und Methoden

### Material

#### 2.1 Bakterienstämme

Tabelle 4 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet oder hergestellt:

<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> Flexneri
BL21 (Stammnummer Labor Adam: 459)	Serogruppe 2a (Stammnr. Adam: 279)
DH5 $\alpha$ (24)	Serogruppe 2a (301)
JM83 (35)	Serogruppe 3a (264)
SK1592 (457)	Serogruppe 4a (289)
TG1 (16)	Serogruppe 6 (278)
DH5 $\alpha$ + pQE30:: <i>cl</i> <sub>pHS-2</sub> (495, M.Abba)	

Weitere *E. coli* Flexneri-Stämme wurden auf Antibiotikaresistenz getestet:

Serogruppe 1a:	266, 295
Serogruppe 1b:	277, 281
Serogruppe 2a:	262, 270, 288, 297
Serogruppe 3b:	303
Serogruppe 4a:	272
Serogruppe 6:	260, 268, 271, 274, 276, 282, 283, 290, 291, 300, 443

#### 2.2 Geräte

Tabelle 5 Geräte

Folgende Geräte wurden eingesetzt:

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller/Firma</i>
Abzug mit Säuren- und Laugenschrank	Köttermann
Autoklaviergerät	
Beckmann L-8-M-Ultrazentrifuge	Beckmann
Begasungsbrutschrank BB 16	Haraeus
Computer Pentium I mit Windows 95	IBM
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer Cetus
Elektronische Waage im $\mu$ g-Bereich A 120 S	Sartorius
Elektronische Waage LC 6201	Sartorius
Elektrophoresegerät PowerPac 3000	BioRad
Elektrophoresekammer Unit Mupid <sup>®</sup> -2	Eurogentec
Elektrophoresekammer MiniPac	BioRad
Fireboy plus	Integra Biosciences
Inkubator 1000 und Unimax-Schüttler 1010	Heidolph
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Kühlschrank -20°C	Liebherr

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller/Firma</i>
Kühlschrank –80°C	Heraeus
Kühlzentrifuge eppendorf centrifuge 5402	Eppendorf
Laminar Flow Box Klasse 2	Antair <sub>BSK</sub>
LI-COR® DNA-Sequencer Modelle 4000 und 4000L	MWG Biotech
LKB Pump P1	Pharmacia
Magnetrühr- und Erwärmungsplatte MR 3001	Heidolph
Metallblock Thermostat Techne-Dri-Block® BD2A	Thermo-Dux
pH-Meter pH <sup>TM</sup>	Beckmann
Pipetboy	Integra Biosciences
Scanmaker Office Plus	Mikrotek
Schwenker Polymax 2040	Heidolph
Standardmikrowellengerät	
Stratagene Eagle Eye <sup>TM</sup> II	Stratagene
Tischzentrifuge centrifuge 5415 C	Eppendorf
Trio-Thermoblock <sup>TM</sup>	Biometra
Ultraspec® III Spektralphotometer	Pharmacia
UV-Transilluminator	Pharmacia
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph
Wasserbad	Bioblock scientific
Western Blot Kammer	BioRad
Zentrifuge K 26 D für große Volumina	MLW

### 2.3 Chemikalien

Tabelle 6 Chemikalien

Auflistung der verwendeten Chemikalien

<i>Abkürzung / Formel</i>	<i>Name / Erläuterung</i>	<i>Bezug</i>
2-Mercaptoethanol		Sigma
3-Aminophtalazin	Luminol	Fluka
4-Jodophenol		Fluka
6 x Loading Dye Solution	Farbmarker, 6fach konzentriert	Fluka
10 x Reaktionspuffer für CIAP	konzentr. Puffer für CIAP	MBI Fermentas
10 x Reaktionspuffer für T4-Ligase	konzentr. Puffer für T4-Ligase	MBI Fermentas
Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	40% in a. bidest.	Fluka
Agar Agar		Roth
Agarose		Roth
Amidoschwarz 10B	Farbmarker	Roth
Ammoniumhydroxid	29,4% konzentriert	Fluka
Ampicillin	Antibiotikum	Aldrich



Abkürzung / Formel	Name / Erläuterung	Bezug
Anti-GST-Antikörper (monoklonal, mouse)	Primärantikörper	Sigma, #G-1160
Anti-GST-Antikörper (polyklonal, rabbit)	Primärantikörper	Santa Cruz, #GST Z5
Anti-mouse-POD-Antikörper	Sekundärantikörper mit gekoppelter Peroxidase	Dianova, #115-035-146
Anti-penta-His-Antikörper	Primärantikörper	Qiagen
Anti-rabbit-POD-Antikörper	Sekundärantikörper mit gekoppelter Peroxidase	Alexa
APS (10%)	Ammoniumpersulfat	Fluka
ATP (250 mM)	Adenosintriphosphat	MBI Fermentas
Aqua bidest. (a. bidest.)	destilliertes Wasser	Braun
BamHI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
BamHI – 10 x Reaktionspuffer	konzentrierter Puffer für BamHI	MBI Fermentas
Borsäure p.A.		Merck
Bromphenolblau	Farbmarker	Sigma
BSA (Pulver)	Bovines Serumalbumin	ICN Biomedicals
BSA (flüssig, gelöst)	Bovines Serumalbumin	MBI Fermentas
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid	Sigma
Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)	DNA Phosphatase	MBI Fermentas
Cfr10I	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
Cfr10I – 10 x Reaktionspuffer	konzentrierter Puffer für Cfr10I	MBI Fermentas
Chloroform p.A.		Roth
DMSO	Dimethylsulfoxide	Sigma
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat	MBI Fermentas
DTT	Dithiothreitol	Roth
EcoRI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Merck
Essigsäure (100%, Eisessig)		Merck
Ethanol (100%)		Roth
Ethidiumbromid		Aldrich
Formaldehyd (37%)		Roth
Formamid		Sigma
G+-Puffer	Puffer für Restriktionsendonukleasen, enthält BSA	MBI Fermentas
Gel Blotting Papier	Papier für Western Blot	Schleicher und Schüll
Glycerol, wasserfrei (100%)		Merck
Glyzin p.A.		Roth
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Wasserstoffperoxid	Merck
HCl (25%)	Salzsäure	Merck
HincII	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
HindIII	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalactosid	
Isopropanol p.A.		Merck
Kaliumacetat		Merck
Kanamycin	Antibiotikum	Sigma
KCl	Kaliumchlorid	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
KOH	Kaliumhydroxid	Merck
LB-Pulver	Luria-Bertani Medium	Fluka
Long Ranger™ DNA	Gellösung für DNA Sequenzier-	FMC BioProducts

Abkürzung / Formel	Name / Erläuterung	Bezug
Sequencing Gel Solution	gele	
Magermilchpulver		
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	Merck
Mineralöl, weiss		Sigma
MnCl <sub>2</sub>	Mangan-(II)-chlorid	Merck
MoBiCol – Extraktionskit	Kit für DNA-Extraktion aus Agarosegelen	MoBiTec
MOPS	3-Morpholino-2-hydroxy-propansulfonsäure	Sigma
NaCH <sub>3</sub> COO	Natriumacetat	Merck
NaCl p.A.	Natriumchlorid	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat	Merck
NaOH	Natriumhydroxid	Merck
Natriumazid (1%)		Merck
NheI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
Nitrozellulosemembran	Optitran BA-S83, Membran für Western Blot	Schleicher und Schüll
NotI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
NotI/EcoRI-Puffer	konz. Puffer für NotI und EcoRI	MBI Fermentas
O+-Puffer	Puffer für Restriktionsendonukleasen mit BSA	MBI Fermentas
pBluescriptKS+	Plasmid/Vektor	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
pBR322	Plasmid/Vektor	DSMZ
Perjodsäure p.A.		Roth
pGEX6P2	Plasmid/Vektor	Amersham Pharmacia
Phenol		Roth
Phenol/Chloroform Gemisch		Roth
Phosphorsäure (85%)		Merck
pQE16	Plasmid/Vektor	Qiagen
Proteinase K (234 U/mg)	Enzym vom Tritirachium album	Fluka
Proteinstandardmarker	Molekulargewichtsmarker	Fluka
PstI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
pUC19	Plasmid/Vektor	New England Biolabs
R+-Puffer	Puffer für Restriktionsendonukleasen mit BSA	MBI Fermentas
Rapid Gel Solution	40%-Gellösung	Amersham
RbCl	Rubidiumchlorid	Merck
SaII	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
SDS	Natriumdodecylsulfat, Detergenz	Sigma
Serva Blue G	Farbmarker	Serva
Silbernitrat		Roth
Spermidin		MBI Fermentas
Stickstoff, flüssig		
SpinPlasmidPrep (Miniprepkit)	Kit für Plasmidpräparation	Qiagen
T4 DNA Ligase	DNA Ligase (Enzym)	MBI Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	Enzym für DNA-Phosphorylier.	MBI Fermentas

Abkürzung / Formel	Name / Erläuterung	Bezug
Taq DNA Polymerase (mit 10 x Reaktionspuffer)	DNA Polymerase (Enzym)	Peqlab
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylen- diamin	Fluka
Thermo Sequenase fluorescent-labelled primer cycle seq. kit	Reagenzien für die DNA-Se- quenzierung	Amersham
Tricine		Roth
Tris base p.A.	Puffer	Roth
Tryptone		Bacto
TSB-Pulver	Tryptic soy broth (Medium)	Fluka
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan, Detergenz	Sigma
Urea p.A.	Harnstoff	Roth
XhoI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
Xylencyanol FF	Farbmarker	Sigma

## 2.4 Verwendete Oligonukleotide

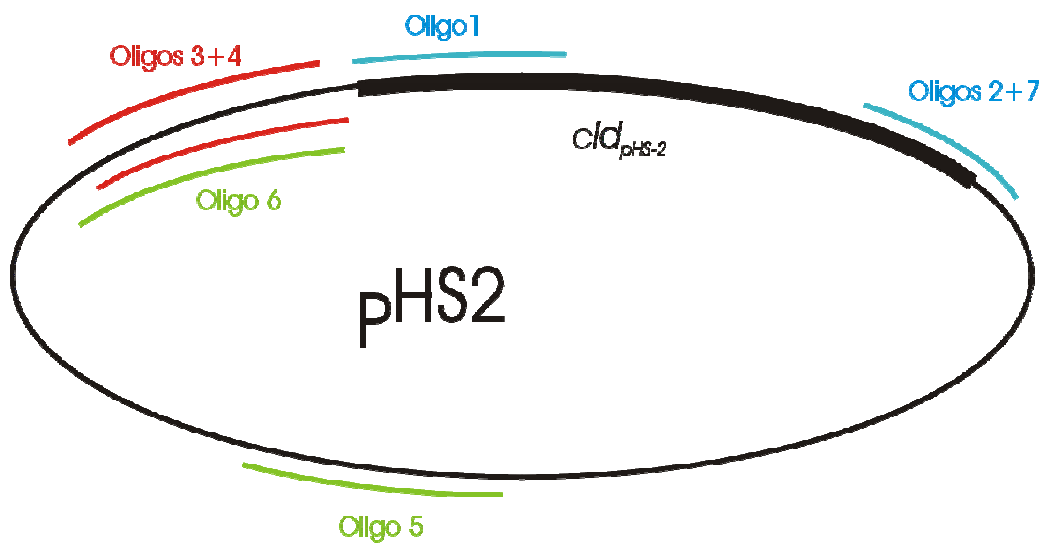
Tabelle 7 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet oder hergestellt:

Nr.	Oligonu- kleotid	Basen -länge	Tm in °C	Sequenzen und Funktionseinheiten (von 5` nach 3`)	forward reverse
1	<i>cl<sub>pHS-2</sub></i> -5- in/outframe	91	75	5`-TTC TGC AGA GCT AGC AGG AAA <u>TGC</u> ACC ATC ACC ATC ACC ATA GGT CGA CGA AAA TCT CAA AGG TCT CTG ACG AAC ATT TTT CTA ATT ACA A-3` 5`-PstI – NheI – <u>ATG</u> (Startcodon) – 6 Histidine (Antigen für Ak) – SalI – <i>cl<sub>pHS-2</sub></i> (Die ersten 40 Basen) -3`	forward
2	<i>cl<sub>pHS-2</sub></i> -3- outframe	54	76	5`-GGG GAT CCC GCG GCC GCT <u>CAA</u> TCA CAC TCA TCT TTC TGG CCC TCC ATG GCA TGA-3` 5`-BamHI - NotI – TGA (Stopcodon) - <i>cl<sub>pHS-2</sub></i> (Die letzten 34 Basen) -3`	reverse
3	Prom1-3- <i>cl<sub>pHS-2</sub></i>	67	67,5	5`-TCG ACC TAT GGT GAT GGT GAT GGT <u>GCA</u> TTG AAA CAC AAT ATA TTA ACA STA TCT CGA GTC TGC A-3` 5`-SalI – 6 Histidine – <u>Start</u> – 27 Basen (natürlicher Promotor vor <i>cl<sub>pHS-2</sub></i> ) – XhoI – PstI-3`	reverse
4	Prom1-5- <i>cl<sub>pHS-2</sub></i>	59	71,5	5`-GAC TCG AGA TAT GTT AAT ATA TTG TGT TTT TTT CAA <u>TGC</u> ACC ATC ACC ATC ACC ATA GG -3` 5`-PstI – XhoI – 27 Basen (natürlicher Promotor vor <i>cl<sub>pHS-2</sub></i> ) – <u>Startcodon</u> – 6 Histidine – SalI-3`	forward

Nr.	Oligonukleotid	Basen-länge	Tm in °C	Sequenzen und Funktionseinheiten (von 5' nach 3')	forward reverse
5	Prom2-5- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i>	53	58,2	5'-ATG TGT CTC CTG CAG ACT <u>CGA</u> GAG AAT TCG GGC ACT GTA TGC GCC CAA ACC GA-3' 5'-9 Überhangbasen – PstI – <u>XhoI</u> – EcoRI – Beginn der 263 Basen (natürlicher Promotor)-3'	forward
6	Prom2-3- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i>	75	52,2	5'-AGA GAT TTT GTC GAC CTA TGG TGA TGG TGA TGG TGC <u>ATT</u> GAA AAA AAC ACA ATA TAT TAA CAT ATG GTT TTT TTA-3' 5'-9 Überhangbasen – Sall – 6 Histidine – <u>Startcodon</u> - Ende der 263 Basen (natürlicher Promotor) -3'	reverse
7	<i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -3- inframe	44	75	5'-GGG GAT CCT CAT CAC ACT CAT CTT TCTGGC CCT CCA TGG CAT GAC GTA A-3' 5'- BamHI - <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> (Die letzten 34 Basen) -3'	reverse
8	M13 uni- versal CS (Oligo90)	23	62,4	Sequenzierprimer 5'-AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT-3'	forward
9	Uni-rev (Oligo 97)	25	61,3	Sequenzierprimer 5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG A-3'	reverse
10	Gene-Ruler DNA-Lad- der Mix			DNA-Marker, MBI Fermentas, Best.-Nr. SM0331	

Grafik 8 Bindungsstellen der Oligonukleotide an pHS-2



## Methoden

### 2.5 Bakteriologische und molekularbiologische Methoden

#### 2.5.1 Bakteriologische Methoden

##### 2.5.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien mit $\text{CaCl}_2$

*LB-Medium (für E. coli):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
LB	2 % (w/v)	Pulver	20 g
a. bidest.			ad. 1000 ml

20 g LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren.

*TSB-Medium (für E. coli Flexneri):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
TSB	3 % (w/v)	Pulver	30 g
a. bidest.			ad. 1000 ml

30 g TSB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren.

Zusätzlich verwendete Materialien
Bakterienstamm ( <i>E. coli</i> oder <i>E. coli</i> Flexneri)
Glycerol 100 %
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), gelöst in a. bidest. (125 mM bzw. 100 mM)

### Arbeitsschritte

Über Nacht wurde ein *Escherichia coli*-Stamm in 10 ml LB (bzw. TSB bei Verwendung von *E. coli* Flexneri) auf dem Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde dann 1:100 in 100 ml des gleichen Mediums (LB oder TSB) verdünnt und bei 37°C etwa zwei Stunden geschüttelt. Die Inkubation wurde bei einer photometrisch gemessenen OD der Kultur von 0,3 beendet (Optische Dichte bei einer Wellenlänge  $\lambda = 600 \text{ nm}$  im Vergleich zu einem sterilen Medium). Eine OD von 0,5 bei einer Wellenlänge  $\lambda = 600 \text{ nm}$  entsprechen ca.  $1 \times 10^8$  Bakterien/ml. Anschließend wurden die 100 ml auf 4 x 25 ml aliquotiert und 10 min bei 4500g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, jedes Pellet wurde in 5 ml  $\text{CaCl}_2$  100 mM gelöst und 20 min auf Eis gestellt. Danach wurde erneut zentrifugiert (10 min bei 4500g), der Überstand verworfen und jedes Pellet in 1 ml

CaCl<sub>2</sub> 125 mM resuspendiert. Die vier Ansätze wurden zusammengegeben, zu den vier Millilitern der Bakteriensuspension wurde 1 ml Glycerol addiert. Nach Aliquotierung wurden die kompetenten Bakterien bei minus 80°C eingefroren.

#### 2.5.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien mit RbCl

##### *Psi broth (pH 7,6):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Pulver	5 g
Tryptone	2 % (w/v)	Pulver	20 g
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	41 mM	Salz (120 g/mol)	5 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Kaliumhydroxid (KOH)	Titrieren bis pH 7,6	Lösung (10 M)	

Fertiges Gemisch bei 121°C über 15 min autoklavieren.

##### *TfB I (pH 5,8):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 200 ml
Kaliumacetat	30 mM	Salz (98,15 g/mol)	590 mg
Rubidiumchlorid (RbCl)	100 mM	Salz (120,92 g/mol)	2,42 g
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	13 mM	Salz (111 g/mol)	294 mg
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	50 mM	Salz (198 g/mol)	2 g
a. bidest.			ad. 200 ml
Essigsäure	Titrieren bis pH 5,8	100 % (flüssig)	

Die fertige Lösung wurde durch 2 µm Porenfilter filtriert.

##### *TfB II (pH 6,5):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 ml
MOPS	10 mM	Pulver (209,27 g/mol)	210 mg
Rubidiumchlorid (RbCl)	10 mM	Salz (120,92 g/mol)	121 mg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	100 mM	Salz (111 g/mol)	1,1 g
a. bidest.			ad. 85 ml
Glycerol	15 % (v/v)	100 % (flüssig)	15 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	Titrieren bis pH 5,8	Lösung (10 M)	

Die fertige Lösung wurde durch 2 µm Porenfilter filtriert.

Zusätzlich verwendete Materialien
Bakterienstamm ( <i>E. coli</i> oder <i>E. coli</i> Flexneri)
LB-Medium (für <i>E. coli</i> , siehe Seite 41)
TSB-Medium (für <i>E. coli</i> Flexneri, siehe Seite 41)

## Arbeitsschritte

1 ml der Übernachtschüttelkultur (*E. coli* in 10 ml LB oder *E. coli* Flexneri in 10 ml TSB) wurde 1:100 in 99 ml Psi broth verdünnt und ca. 3 Stunden bei 37°C schütteln lassen. Die Inkubation wurde gestoppt, als am Photometer eine OD von 0,48 bei einer Wellenlänge  $\lambda = 550$  im Vergleich zum sterilen Psi broth gemessen werden konnte. Dann wurden die Bakterien 15 min auf Eis gestellt, ehe sie 5 min bei 4500g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 40 ml TfB I resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Wiederum wurde dann 5 min bei 4500g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml TfB II resuspendiert. Danach wurden die kompetenten Bakterien 15 min auf Eis gestellt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### 2.5.1.3 Transformation und Isolierung kompetenter Bakterien

#### LB-Agar-Platten:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Agarose	1,5 % (w/v)	Pulver	15 g
LB	2 % (w/v)	Pulver	20 g
a. bidest.			ad. 1000 ml

Agarose und LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen, bei 121°C über 15 min autoklavieren und Platten gießen. Bei Verwendung Ampicillin-resistenter Bakterien nach dem Abkühlen auf ca. 50-60°C und vor dem Gießen 2 ml Ampicillinlösung (Endkonzentr. 0,1 mg/ml) hinzufügen.

#### LB-Medium (für *E. coli*):

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
LB	2 % (w/v)	Pulver	20 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Ampicillinlösung	1 mg/ml	50 mg/ml, s. Seite 46	2 ml

20 g LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren. Bei Verwendung ampicillinresistenter Bakterien nach dem Abkühlen 2 ml Ampicillinlösung hinzufügen.

#### TSB-Medium (für *E. coli* Flexneri):

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
TSB	3 % (w/v)	Pulver	30 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Ampicillinlösung	1 mg/ml	50 mg/ml, s. Seite 46	2 ml

20 g LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren. Bei Verwendung ampicillinresistenter Bakterien nach dem Abkühlen 2 ml Ampicillinlösung hinzufügen.

<b>Zusätzlich verwendete Materialien</b>
150 µl kompetente Bakterien ( <i>E. coli</i> oder <i>E. coli</i> Flexneri)
1 µl Plasmid-DNA (meist mit Ampicillinresistenz)

### Arbeitsschritte

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten kompetenten Bakterien wurden auf Eis ausgefroren. Nachdem 150 µl Bakterien 1 µg Plasmid-DNA zugegeben wurde, ließ man die Bakterien mit DNA 20 min auf Eis inkubieren. Durch einen zweiminütigen Hitzeschock im Wasserbad bei  $42^{\circ}\text{C}$  wurde die DNA in kompetente *E. coli* transformiert (bei Verwendung von kompetenten *E. coli* Flexneri: 5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$ ). Sofort danach wurde den 150 µl (transformierten) Bakterien 800 µl ihres Mediums (LB bei *E. coli*-Stämmen und TSB bei Shigellen) zugeführt. Die Suspension wurde eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wärmeblock inkubiert und dann in der Tischzentrifuge 3 min bei 8000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 70 µl LB oder TSB aufgenommen und auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin bei Plasmidresistenz) ausgestrichen. Über Nacht wurden die Platten in den Inkubationsschrank ( $37^{\circ}\text{C}$ ) gestellt. Die Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle (Ausstreichen und Inkubieren kompetenter Bakterien ohne Ampicillinresistenz auf einer LB-Agar-Ampicillin-Platte) geprüft, bei der kein Wachstum von Kolonien auftreten durfte.

Die gewünschten Kolonien von transformierten Bakterien wurden mittels einer Öse auf einer weiteren LB-Agarplatte (mit Ampicillin bei bakterieller Resistenz) fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert, um Satellitenkolonien zu vermeiden und selektives Wachstum zu erreichen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Nun wurde jede gewünschte Kolonie mit dem entsprechenden Flüssigmedium (10 ml LB oder TSB, wenn möglich mit Antibiotikum) versehen und auf dem Schüttler über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  wachsen gelassen. 900 µl dieser Kultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, 300 µl Glycerol wurden addiert (Verhältnis 1:4) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die restlichen 9,1 ml der Schüttelkultur konnten für



eine Mini-Prep und PCR verwendet werden, um eine gelungene Transformationsreaktion zu kontrollieren.

#### 2.5.1.4 Minimale Hemmkonzentration (MHK) für einen Bakterienstamm (Resistenzprüfung)

*Beispiel:* Resistenzprüfung von Stamm 278 (*E. coli* Flexneri Serogruppe 6) auf Ampicillin

Verwendete Materialien
Stamm 278 ( <i>E. coli</i> Flexneri Serogruppe 6, Arbeitsgruppe Adam)
LB-Agar-Platten (siehe Seite 43)
TSB-Medium (siehe Seite 43)
Ampicillinlösung (50 mg/ml, siehe Seite 46)

### Arbeitsschritte

Ein Bakterienstamm (hier: *E. coli* Flexneri S 278), dessen Ampicillinresistenz unbekannt und damit zu prüfen war, wurde über Nacht in 10 ml Medium (hier: TSB) bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 1:50 in 10 ml des gleichen Mediums verdünnt und erneut bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Bei einer  $OD_{600} 0,5$ , die am Photometer im Vergleich zum sterilen Medium gemessen wurde (Eine OD von 0,5 bei einer Wellenlänge  $\lambda = 600 \text{ nm}$  entsprechen ca.  $2 \times 10^8$  Bakterien/ml), wurde die Inkubation abgebrochen. Parallel wurden 10 Falcontubes mit je 3 ml TSB vorbereitet. In jedes tube wurden  $9 \times 10^5$  Bakterien pipettiert, das entspricht 4,5  $\mu\text{l}$  der zuvor gemessenen Bakterienkultur. In ein Röhrchen wurde kein Ampicillin hinzugefügt (Positivkontrolle), in die anderen 9 tubes wurde abgestuft soviel Ampicillin addiert, dass eine Verdünnungsreihe entstand. Die Antibiotikaendkonzentrationen sollten sich von Probe zu Probe jeweils verdoppeln (0,05 bis 12,8  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach einer Inkubation der Proben auf dem Schüttler bei 37°C über Nacht konnte die Konzentration der gewachsenen Bakterien anhand der  $OD_{600}$  von 0,5 berechnet werden. Bei einem Wachstum von Bakterien in einer Lösung mit einer Konzentration  $>3,2 \mu\text{g/ml}$  Ampicillin muss von einer Resistenz ausgegangen werden. Eine Resistenz kann zusätzlich unter Verwendung von Festmedien bestimmt werden. Dabei werden je 70  $\mu\text{l}$  aus den Übernachtskulturen mit der abgestuften

Ampicillinkonzentration auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Ein Wachstum von Bakterienkolonien bedeutet eine Resistenz gegenüber der jeweiligen Ampicillinkonzentration.

## 2.5.2 Molekularbiologische Methoden

### Arbeiten mit DNA – Allgemeine Methoden

#### 2.5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

mittels Qiagen Spin Miniprep Kit (46), modifiziert nach dem Protokoll des Herstellers

##### *Ampicillinlösung:*

Substanz	Endkonzentration	Stock	Menge auf 30 ml
Ampicillin	50 mg/ml (5 % w/v)	Pulver	1,5 g
a. bidest.			ad. 30 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	Titrieren, bis Lösung farblos ist	Lösung (1 M)	

1,5 g Ampicillin in 25 ml a. bidest. lösen, auf 50°C unter Rühren erhitzen und solange mit NaOH titrieren, bis die Lösung farblos wird. Danach wurde die Lösung mit a. bidest. auf 30 ml aufgefüllt und aliquotiert.

##### *LB-Medium (für E. coli):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
LB	2 % (w/v)	Pulver	20 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Ampicillinlösung	1 mg/ml	50 mg/ml, s. Seite 46	2 ml

20 g LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren. Bei Verwendung ampicillinresistenter Bakterien nach dem Abkühlen 2 ml Ampicillinlösung hinzufügen.

##### *EDTA-Lösung (pH 8,0):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
EDTA	0,5 M	Pulver (372,24 g/mol)	186,1 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	Titrieren bis pH 8,0	Lösung (1 M)	

##### *10x TE mod. (pH 8,0, verwendet wurde 1x TE mod.):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Tris Base	0,1 M	Pulver (121 g/mol)	12,14 g
a. bidest.			ad. 980 ml
EDTA-Lösung	10 mM EDTA	0,5 M EDTA-Lösung (s. Seite 46)	20 ml

Salzsäure (HCl)	Titrieren bis pH 8,0	Lösung (3 M)	
-----------------	----------------------	--------------	--

Puffer mit HCl bis pH 8,0 titrieren und mit Porenfiltern (Nalgene, 0,45 µm) filtrieren. Bei Gebrauch Puffer 1:10 mit a. bidest. verdünnen (1x TE mod.).

*Puffer P2:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 10 ml
SDS, gelöst in a. bidest.	34 mM	10 %ige Lösung (0,34 M)	1 ml
a. bidest.			7 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	0,2 M	Lösung (1 M)	2 ml

Zusätzlich verwendete Materialien
Plasmidhaltiger Bakterienklon
Qiagen Spin Miniprep Kit
Puffer PE (entspricht Ethanol 80 %)

## Arbeitsschritte

Der plasmidhaltige Bakterienklon wurde über Nacht in 10 ml LB (TSB bei *E. coli* Flexneri, mit 20 µl Ampicillinlösung bei Plasmidresistenz) inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 4500g ca. 5 min abzentrifugiert, das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 (enthält RNase A) des Miniprep Kits resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl des frisch hergestellten Puffers P2 zur Lyse der Bakterien und Freisetzung der Plasmide hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Standzeit wurden dem Gemisch 350 µl Puffer P3 des Miniprep Kits addiert. Nach leichtem Schwenken wurde das Gemisch 10 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 10000g zentrifugiert. Das Pellet mit den lysierten Bakterien wurde verworfen, der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine QIAprep spin Säule (aus Miniprep Kit) pipettiert und 45 sec bei 10000g zentrifugiert. Mit 500 µl Puffer PB des Kits wurde die Säule gewaschen und wieder 45 Sekunden bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Ein letzter Waschschrift mit 750 µl Puffer PE wurde durchgeführt und zweimal eine Minute bei 10000g zentrifugiert. Die an die Säule gebundenen Plasmide wurden anschließend mit 50 µl 1x TE mod. nach einer Inkubationszeit von 1 min und einem

einminütigen Zentrifugieren bei 10000g eluiert. Das Plasmid-TE mod.-Gemisch wurde zur Weiterverwendung auf Eis gestellt.

#### 2.5.2.2 Aufreinigung von DNA über Phenol/Chloroform-Extraktion

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge
Plasmid-DNA, gelöst in 1xTE mod.			50 µl
1x TE mod.	0,5x Lösung	10x TE mod. 1:10 verdünnt in a. bidest. (siehe Seite 46)	ca. 350 µl
Phenol	50 % (v/v)	Lösung (100 %)	400 µl
Phenol/Chloroform- Gemisch (50:50)	50 % (v/v)	Lösung (100 %)	400 µl
Chloroform	50 % (v/v)	Lösung (100 %)	400 µl

#### Arbeitsschritte (alle Schritte unter dem Abzug!)

Die gelöste Plasmid-DNA wurde mit 1 x TE mod. auf 400 µl aufgefüllt. Nach dem Aufpipettieren von 400 µl Phenol (aus dem Kühlschrank) wurde das Gemisch 2 min gevortext, anschließend 15 min bei 4°C und 14000g (Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Der hydrophile Überstand mit der DNA wurde abpipettiert und in ein neues Gefäß gegeben, das hydrophobe Phenol wurde in einem entsprechenden Gefäß entsorgt. Der gelösten Plasmid-DNA wurden nun 400 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches (Kühlschrank) zugefügt. Nach zweiminütigem Vortexen und Zentrifugieren (15 min in der Kühlzentrifuge) wurde wiederum der wässrige DNA-Überstand in ein anderes Gefäß überpipettiert, das hydrophobe Gemisch wurde entsorgt. Beim letzten Aufreinigungsschritt wurden 400 µl Chloroform (Raumtemperatur) mit der gelösten Plasmid-DNA durch zweiminütiges Vortexen vermischt und zentrifugiert (5 min in der Kühlzentrifuge). Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Gefäß übernommen und auf Eis für die Ethanolpräzipitation bereitgestellt, das Chloroform wurde verworfen.

### 2.5.2.3 Ethanolpräzipitation von DNA

Verwendete Materialien	Endkonzentr.	Stock
Plasmid-DNA, gelöst in 1xTE mod.		
Natriumazetat	100 mM	Lösung (3 M, pH 5,2)
Ethanol	47 % bzw. 66 % (v/v)	Lösung (70 % bzw. 100 % (v/v))
a. bidest.		

### Arbeitsschritte

Die nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigte Plasmid-DNA (gelöst in ca. 400 µl 1xTE mod.) wurde mit 800 µl Ethanol 100% (aus –20°C Gefrierschrank) und mit 40 µl 3 M Essigsäure pH 5,2 aufgefüllt, 1 min gevortext und über Nacht bei –20°C präzipitieren lassen. Danach wurde 15 min bei –2°C und 14000g (Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde vorsichtig abgenommen, das DNA-Pellet in 1 ml Ethanol 70% (aus –20°C Gefrierschrank) resuspendiert und wiederum bei gleichen Bedingungen 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Waschschrift mit Ethanol 70% wiederholt. Anschließend wurde dem DNA-Pellet 200 µl Ethanol 100% zugegeben. Bei gleichen Bedingungen wurde 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde aspiriert und das DNA-Pellet wurde nach Verdunstung des restlichen Ethanols in 50 µl a. bidest. resuspendiert.

### 2.5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Photometrische DNA-Messung:

In eine Quarzküvette mit einem Durchmesser von 10 mm wurden 696,5 µl a. bidest. und 3,5 µl gelöste DNA pipettiert. Bei der verwendeten Wellenlänge von 260 nm entspricht eine OD von

1,000 am Photometer ca. 50 µg Doppelstrang-DNA/ml, 40 µg Einzelstrang-DNA/ml, oder 20 µg Oligonukleotide/ml (164).

#### 2.5.2.5 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

50x TAE-Puffer (verwendet wurde 0,5x TAE):

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Tris Base	2 M	Pulver (121 g/mol)	242 g
EDTA-Lösung	0,05 M EDTA	0,5 M EDTA (siehe Seite 46)	100 ml
Essigsäure	5,7 % (v/v)	Lösung (100 %)	57,1 ml
a. bidest.			ad. 1000 ml

Agarosegel-Ansatz:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 ml
Agarose	0,0015 % (w/v)	Pulver	1,5 mg
50x TAE-Puffer	0,5x Lösung	50x Lösung (siehe Seite 50)	1 µl
a. bidest.			ad. 1000 ml

DNA-Elektrophorese-Ansatz:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 20 µl
DNA-Probe			10 µl
50x TAE-Puffer	0,5x Lösung	5x Lösung (50x TAE 1:10 in a. bidest. verdünnt, s. Seite 50)	2 µl
6x Loading Dye Solution (Farbmarker)	0,9x Lösung	6x Lösung	3 µl
a. bidest.			5 µl

Zusätzlich verwendete Materialien
GeneRuler DNA Ladder Mix (DNA-Marker, MBI), siehe 2.4, Seite 39
Ethidiumbromid, gelöst in a. bidest. (Stocklösung 10 mg/ml)

#### Arbeitsschritte

In einem Erlenmeyerkolben wurden 100 ml eines Agarosegel-Ansatzes ca. 5 min in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose gelöst war. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in eine vorgefertigte Form gegossen, in die ein Kamm eingesetzt wurde. Nach dem Erstarren des Gels, wurde der Kamm gezogen und das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt. Anschließend

wurde die Kammer mit einer 0,5x TAE-Lösung (50x TAE-Puffer 1:100 verdünnt mit a. bidest.) gefüllt. In jede Tasche (Spur) des Gels wurden 20 µl DNA-Elektrophorese-Ansatz pipettiert. In eine Tasche (Spur) wurde ein DNA-Marker-Ansatz aufgetragen. Dieser bestand aus 2 µl Gene Ruler Ladder Mix, 3 µl 6x Loading Dye Solution und 15 µl 0,66x TAE-Puffer (50x TAE-Puffer 1:75 verdünnt mit a. bidest.). Die Elektrophoresekammer wurde geschlossen, eine elektrische Verbindung hergestellt und mit 10 V/cm gestartet. Nach einer Laufzeit von ca. 45 min wurde das Gel ca. 20 Minuten in ein Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in a. bidest.) gelegt. Anschließend konnten die DNA-Fragmente mittels UV-Transilluminator oder Eagle Eye dargestellt werden.

#### 2.5.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Mobicol (Mo Bi Tec)

Verwendete Materialien
Agarosegel mit DNA-Banden
Mobicol (1 ml Säulen mit Deckel, Mo Bi Tec, Best.-Nr.M1002) mit 2 ml Gefäß
10 µl Porenfilter (Mo Bi Tec, #M2210)
a. bidest.

#### Arbeitsschritte

Alle Arbeitsschritte wurden mit Schutzhandschuhen durchgeführt.

Die mittels Gelelektrophorese getrennten Banden konnten nach einem ca. zwanzigminütigen Ethidiumbromidbad auf dem UV-Transilluminator dargestellt werden. Die erwünschte Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in eine Mobicolsäule, versehen mit einer Fritte, gegeben. Nachdem die Säule in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingepasst wurde, konnte die DNA durch ein zehnminütiges Zentrifugieren bei 4°C und 10000g (Kühlzentrifuge Eppendorf) verflüssigt werden. Die filtrierte DNA-Lösung im Gefäß wurde mit a. bidest. auf 400µl

aufgefüllt und durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation gereinigt.

#### 2.5.2.7 Hybridisierung zweier Oligonukleotide

##### Hybridisierungs-Ansatz:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 µl
Oligonukleotid 3 (siehe 2.4, Seite 39)		Lösung (40 µM)	17,5 µl
Oligonukleotid 4 (siehe 2.4, Seite 39)		Lösung (40 µM)	17,5 µl
a. bidest.			55 µl
Natriumchlorid (NaCl)	0,1 M	Salz (58,44 g/mol)	5,84 mg

##### Berechnung der Schmelztemperatur von Oligonukleotiden:

$T_m = 81,5 + 0,4 (G + C) + 16,6 \log Na - 500 / d$
(G + C) = prozentualer Anteil an Guanosin und Cytosin Na = Molarität einwertiger Kationen d = Länge des Oligonukleotids

##### Arbeitsschritte

Je 17,5 µl der gelösten Oligonukleotide 3 und 4 (entspricht je 700 pmol, siehe Kapitel 2.4, Seite 39) wurden zu einem Hybridisierungs-Ansatz pipettiert. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit bei 95°C im Wärmeblock hat man die Lösung abkühlen lassen, bis die Temperatur knapp unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide gesunken ist (60 bis 65°C). Auf Eis gestellt konnte das Hybridisierungsprodukt für weitere Verarbeitungsschritte verwendet werden.



## Arbeiten mit DNA – Enzymatische Methoden

## 2.5.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

*Restriktions-Ansatz:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 30 µl
Plasmid-DNA			30 µg
Restriktionsendonuklease	0,33 U/µl	10 U/µl	1 µl
Kompatibler Reaktionspuffer	1x-Lösung (v/v)	10x Lösung	3 µl
BSA, flüssig	1 µg/µl	20 µg/µl	1,5 µl
a. bidest.			ad. 30 µl

Verwendete Restriktionsendonukleasen mit entsprechenden kompatiblen Puffern:

Verwendete Endonukleasen	Kompatible Reaktionspuffer	BSA-Zusatz (Endkonz. 1 µg/µl)
BamHI	BamHI-Puffer	X
CfR10I	CfR10I-Puffer	X
EcoRI	EcoRI/NotI-Puffer	X
HincII	G <sup>+</sup> -Puffer	
HindIII	R <sup>+</sup> -Puffer	
NheI	Y <sup>+</sup> /Tango-Puffer	
NotI	EcoRI/NotI-Puffer	X
PstI	O <sup>+</sup> -Puffer	
SalI	O <sup>+</sup> -Puffer	

**Arbeitsschritte**

1 U Restriktionsendonuklease spaltet 1 µg Plasmid-DNA vollständig in einer Stunde. Bei einer Inkubationszeit von drei Stunden und einer geläufigen Enzymkonzentration von 10 U/µl, benötigt man 1 µl Enzym, um 30 µg DNA zu schneiden. Die Volumenmenge an DNA hängt von der Konzentration der gelösten DNA ab. 1 µl Enzym und 30 µg Plasmid-DNA wurden zu 20 µl a. bidest. pipettiert, anschließend wurden 3 µl eines zehnfach konzentrierten, kompatiblen Endonukleasepuffers zugefügt. Bei einigen Puffern war der Zusatz von 1,5 µl BSA notwendig, ehe der Restriktions-Ansatz mit a. bidest. auf 30 µl aufgefüllt werden konnte. Das Enzym sollte immer 1:30 im Gesamtansatz verdünnt sein, damit das Glycerol der Enzymlösung die Reaktion nicht stört. Die Lösung wurde bei der für das Enzym spezifischen Reaktionstemperatur (meist

37°C) im Wärmeblock 3 Stunden inkubiert. Danach wurde das Enzym mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation inaktiviert. Einige Restriktionsendonukleasen können auch durch eine 10 minütige Erwärmung auf 65°C denaturiert werden. Anschließend kann die aufgetrennte Plasmid-DNA mit einer zweiten Restriktion geschnitten werden, um z.B. ein Fragment herauszulösen, ehe die Fragmente gelelektrophoretisch getrennt werden können.

#### 2.5.2.9 Phosphorylierung der doppelsträngigen DNA

*10x Phosphorylierungspuffer (pH 7,6, verwendet wurde 1x Puffer):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 10 ml
Tris Base	0,5 M	Pulver (121 g/mol)	0,6 g
a. bidest.			ad. 10 ml
Salzsäure (HCl)	Titrieren bis pH 7,6	Lösung (3 M)	
EDTA	1 mM	Pulver (372,24 g/mol)	3,72 mg
DTT	50 mM	Pulver (154,25 g/mol)	77 mg
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	100 mM	Salz (203,30 g/mol)	203 mg
Spermidin	1 mM	Lösung (1 M)	10 µl

Tris Base in 10 ml a. bidest. lösen und auf einer Wärmeplatte bei 35°C mit HCl auf pH 7,6 titrieren, anschließend EDTA, DTT, MgCl<sub>2</sub> und Spermidin zufügen.

*Phosphorylierungs-Ansatz:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 µl
Doppelstrang-DNA (z.B. hybridisierte Oligonukleotide)			50 pmol
a. bidest.			ad. 90 µl
10x Phosphorylierungspuffer	1x Lösung	10x Lösung, siehe Seite 54	10 µl
T4-Polynukleotid Kinase	0,015 U/µl	Lösung (10 U/µl)	0,15 µl
ATP	2,5 mM	Lösung (250 mM)	1 µl

### Arbeitsschritte

Zu einem Phosphorylierungs-Ansatz wurden 50 pmol Doppelstrang-DNA pipettiert. Eine doppelsträngige DNA besitzt zwei 5'-OH-Enden, damit verdoppelt sich die zu

phosphorylierende Menge (= 100 pmol). Da 0,1 U T4-Polynukleotidkinase 100 pmol in 30 Minuten phosphorylieren, wurden dem Ansatz 0,15 µl Enzym zugegeben. ATP wurde mit 1 µl im Überschuss zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit des Ansatzes von einer Stunde bei 37°C im Wärmeblock wurde das Enzym durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation inhibiert.

#### 2.5.2.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

##### *Dephosphorylierungs-Ansatz:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 50 µl
Phosphorylierte Doppelstrang-DNA			20 pmol
a. bidest.			ad. 44,5 µl
10x Reaktionspuffer für CIAP	1x Lösung	10x Lösung	5 µl
Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)	0,11 U/µl	Lösung (11 U/µl)	0,5 µl

### Arbeitsschritte

Die zu dephosphorylierenden DNA-Enden berechnen sich je nach zirkulärer DNA (pmol DNA x Restriktionsstellen x 2) und linearer DNA (pmol DNA x Restriktionsstellen x 2 + 2) unterschiedlich. Das bedeutet, dass die zu dephosphorylierenden Enden bei 20 pmol einer zirkulären DNA (Plasmid) mit zwei Schnittstellen 80 pmol betragen. Um 1 pmol DNA zu dephosphorylieren, benötigt man 0,05 Units CIAP.

20 pmol aufgetrennte Plasmid-DNA wurden zu einem Dephosphorylierungs-Ansatz pipettiert und 30 min bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation inaktiviert. Die dephosphorylierte DNA konnte nun für eine Ligation verwendet werden.

### 2.5.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

#### Ligations-Ansatz:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 40 µl
Geöffnete, dephosphorylierte Plasmid-DNA als Vektor			Verhältnis 1:2 zum Insert
Phosphorylierte Doppelstrang-DNA als Insert			Verhältnis 2:1 zum Vektor
a. bidest.			ad. 33,5 µl
10x Puffer für T4 DNA-Ligase	1x Lösung	10x Lösung	4 µl
T4 DNA-Ligase	0,1 U/µl	Lösung (2 U/µl)	2 µl
Flüssiges BSA	0,25 µg/µl	20 µg/µl	0,5 µl

#### Ampicillinlösung:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 30 ml
Ampicillin	50 mg/ml (5 % w/v)	Pulver	1,5 g
a. bidest.			ad. 30 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	Titrieren, bis Lösung farblos ist	Lösung (1 M)	

1,5 g Ampicillin in 25 ml a. bidest. lösen, auf 50°C unter Rühren erhitzen und solange mit NaOH titrieren, bis die Lösung farblos wird. Danach wurde die Lösung mit a. bidest. auf 30 ml aufgefüllt und aliquotiert.

#### LB-Agar-Platten:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Agarose	1,5 % (w/v)	Pulver	15 g
LB	2 % (w/v)	Pulver	20 g
a. bidest.			ad. 1000 ml

Agarose und LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen, bei 121°C über 15 min autoklavieren und Platten gießen. Bei Verwendung Ampicillin-resistenter Bakterien nach dem Abkühlen auf ca. 50-60°C und vor dem Gießen 2 ml Ampicillinlösung (Endkonzentr. 0,1 mg/ml) hinzufügen.

#### Arbeitsschritte

Zunächst wurde als Negativkontrolle eine Verdünnungsreihe mit der geschnittenen, dephosphorylierten Plasmid-DNA durchgeführt, um die höchste Konzentration des Vektors zu erhalten, bei der keine Religationsklone gewachsen sind. Dabei wurden fünf Ligations-Ansätze mit je 0,04 fmol, 0,2 fmol, 2 fmol, 10 fmol und 50 fmol geschnittener Plasmid-DNA ohne Insert sowie eine Negativkontrolle ohne DNA angefertigt. Nach einer 90minütigen Inkubationszeit bei 16°C im Thermocycler wurde die Ligase durch Hitze (15 min bei 65°C) inaktiviert. Anschließend wurde jede Probe in je 150 µl kompetente *E. coli* DH5α (siehe 2.5.1.1, Seite 41)

transformiert und auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die größte DNA-Menge, die keine Religationsklone und somit kein Wachstum auf der Platte hervorrief, konnte für die Ligation verwendet werden.

Die in der Verdünnungsreihe ermittelte Menge Plasmid-DNA wurde in einem Ligations-Ansatz vermischt. Anschließend wurde in einem Verhältnis von 2:1 zur Plasmid-DNA phosphorylierte Doppelstrang-DNA zugesetzt. Nach einer Inkubation (90 min bei 16°C, usw.) und einer Transformation in 150 µl kompetente *E. coli* DH5α wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Gewachsene Einzelkolonien wurden subkultiviert und mittels Mini-Prep und PCR auf ihren Inhalt kontrolliert.

#### 2.5.2.12 Durchführung einer PCR

*PCR-Ansatz:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 µl
template-DNA (Plasmid-DNA)			1 µl
a. bidest.			78,75 µl
10x Polymerase-Reaktionspuffer	1x Lösung	10x Lösung	10 µl
Taq DNA-Polymerase	0,0125 U/µl	Lösung (5 U/µl)	0,25 µl
dNTP-Lösung (enthält A, C, G, T)	0,05 mM	Lösung (2 mM)	2,5 µl
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	1,5 mM	Lösung (25 mM)	6 µl
Flüssiges BSA	0,1 µg/µl	20 µg/µl	0,5 µl
Ein „forward“-Oligonukleotid (z.B. Oligonukleotid 1, siehe Seite 39)	0,2 µM	40 µM	0,5 µl
Ein „reverse“-Oligonukleotid (z.B. Oligonukleotid 2, siehe Seite 39)	0,2 µM	40 µM	0,5 µl

Der PCR-Ansatz (100 µl) wurde in einem 500 µl fassenden Eppendorff tube vermischt und mit 70 µl Mineralöl bedeckt.

#### Arbeitsschritte

Ein vermischter und mit Mineralöl bedeckter PCR-Ansatz und eine Negativkontrolle (Gleicher Ansatz ohne Plasmid-DNA) wurden in den DNA Thermal Cycler 480 gegeben, um anschließend mit folgendem Reaktionszyklus eine PCR zu starten.

## PCR-Reaktionszyklus:

1. Zyklus	-3 min Denaturierung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge bei 94°C -2 min Primerbindung bei einer Annealing-Temperatur von 45°C -1 min Extension bei 72°C
2.-29. Zyklus	-1 min Denaturieren bei 94°C -30 sec „annealing“ bei 47°C (Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt) -1 min Extension bei 72°C
30. Zyklus	-1 min denaturieren bei 94°C -30 sec „annealing“ bei 47°C -1 min Extension bei 72°C

Danach wurde das Reaktionsgemisch unter dem Öl abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation gereinigt, ehe die PCR-Reaktion gelelektrophoretisch kontrolliert wurde.

## 2.5.2.13 DNA-Sequenzierung

## A) Sequenzierreaktion

## Stop-Reagenz:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 50 ml
Bromphenolblau	1,4 mM	Pulver (691.94 g/mol)	50 mg
Xylenxanol FF	0,1 % (w/v)	Pulver	50 mg
Formamid	1 mg/ml	Lösung (100 % v/v)	49 ml
EDTA-Lösung	10 mM EDTA	EDTA-Lösung (0,5 M), s. Seite 46	1 ml

Zusätzlich verwendete Materialien	Stock-Lösung	Endkonzentration
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham)		
Gereinigte Plasmid-DNA		0,01 mmol/l
Primer (z.B. Oligonukleotid 8, siehe 2.4, Seite 39) mit 5'-Infrarot-Fluoreszenzmarker IRD800	2 pmol/μl	0,15 mmol/l
Mineralöl		
a. bidest.		

## Arbeitsschritte

In einer Vorverdünnung wurden 0,25 pmol gereinigte Plasmid-DNA in 24 µl a. bidest. verdünnt und 2 µl Primer (z.B. Oligonukleotid 8, siehe 2.4, Seite 39) hinzugefügt. Aus dieser Lösung wurden je 6 µl in vier verschiedene 500 µl Reaktionsgefäße überpipettiert. Die ganzen Materialien wurden bei –20°C gelagert und waren sehr temperaturempfindlich, deshalb musste bei dem ganzen Versuch streng auf Eis gearbeitet werden. Die vier tubes beinhalteten je 6 µl einer Mischung aus Plasmid-DNA und Primer, die tubes wurden mit A, T, C und G beschriftet. In das tube A wurden 2 µl Reagenz A gegeben, in das tube T 2 µl Reagenz T, usw. Die Reagenzien A, T, C und G entstammen aus einem Sequencing Kit (Amersham) und beinhalteten neben einem Puffer und dem Enzym Sequenase die markierten Nukleinsäuren Adenosin, Thymin, Cytosin und Guanodin. Anschließend wurden die vier Reaktionsansätze mit je 30 µl Mineralöl überschichtet. In einem Thermo Cycler (siehe PCR, 2.5.2.12, Seite 57) wurde die Reaktion gestartet.

Zyklus 1	-5 min Denaturieren der DNA bei 95°C
Zyklus 2 bis 31	-30 sec Denaturieren bei 95°C -30 sec „annealing“ bei 55°C -60 sec Extension bei 70°C

Während der Reaktion synthetisierte die Sequenase zu dem DNA-Einzelstrang einen Komplementärstrang mit den markierten Nukleinsäuren. Nach den 31 Zyklen wurden bei jedem Ansatz 6 µl Stop-Reagenz unter das Öl pipettiert, die Sequenase wurde nach einer Reaktionszeit von 5 min bei 95°C inaktiviert.

## B) Herstellung des Sequenziergels

*10x TBE-Puffer (Arbeitslösung ist 1x TBE-Puffer):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Tris Base	0,89 M	Pulver (121 g/mol)	108 g
Borsäure	0,88 mM	Pulver (61,83 g/mol)	55 mg

a. bidest.			960 ml
EDTA-Lösung	20 mM EDTA	0,5 M EDTA-Lösung, s. Seite 46	40 ml

*Sequenziergellösung (für ein kleines Gel):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 50 ml
Urea (Harnstoff)	7 M	Pulver (60 g/mol)	21 g
10x TBE-Puffer	1,2x	10x Lösung (siehe Seite 58)	6 ml
Long-ranger gel solution (FMC Bio Products, Best.Nr.50611)	6 % (v/v)	50 %ige Lösung	6 ml
a. bidest.			ad. 50 ml
TEMED	0,048 % (v/v)	100 %ige Lösung (v/v)	24 µl
APS	0,048 % (v/v)	10 %ige Lösung (v/v)	240 µl

Der Harnstoff wurde in 34 ml a. bidest. und 6 ml 10x TBE-Puffer im Wasserbad bei 37°C gelöst. Anschließend wurde die Long-ranger gel solution bei Aufbau eines kleinen Gels zugegeben. Die Lösung wurde mittels Cellulose-acetat Filter (0,45 µm Porengröße, Nalgene) von ungelösten Substanzen gereinigt, mit a. bidest. auf 50 ml aufgefüllt und auf Eis gestellt. TEMED und APS wurden erst kurz vor dem Pipettieren der Lösung in die Gelfassung (kleine Glasscheiben) zugefügt.

*Sequenziergellösung (für ein großes Gel):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 50 ml
Urea (Harnstoff)	7 M	Pulver (60 g/mol)	21 g
10x TBE-Puffer	1,2x	10x Lösung (siehe Seite 58)	6 ml
Rapid gel solution (Best. Nr.75863, Amersham)	4,48 % (v/v)	40 %ige Lösung (v/v)	5,6 ml
DMSO	1 % (v/v, ca. 6,4 mM)	100 %ige Lösung (v/v, 78,13 g/mol)	0,5 ml
a. bidest.			ad. 50 ml
TEMED	0,048 % (v/v)	100 %ige Lösung (v/v)	24 µl
APS	0,048 % (v/v)	10 %ige Lösung (v/v)	240 µl

Der Harnstoff wurde in 34 ml a. bidest. und 6 ml 10x TBE-Puffer im Wasserbad bei 37°C gelöst. Anschließend wurden die Rapid gel solution und DMSO bei Aufbau eines großen Gels zugegeben. Die Lösung wurde mittels Cellulose-acetat Filter (0,45 µm Porengröße, Nalgene) von ungelösten Substanzen gereinigt, mit a. bidest. auf 50 ml aufgefüllt und auf Eis gestellt. TEMED und APS wurden erst kurz vor dem Pipettieren der Lösung in die Gelfassung (große Glasscheiben) zugefügt.

Zusätzlich verwendete Materialien
a. bidest.
Ethanol 100 %
Glasscheiben (Zwei kleine bzw. große Scheiben mit einer Größe von 41 x 24,5 cm bzw. 66 x 24,5 cm)



## Arbeitsschritte

Zwei (kleine bzw. große) Glasplatten wurden gründlich mit a. bidest. und Ethanol 100% gesäubert, aufeinandergelegt, seitlich durch zwei Spacer (Dicke 0,5 mm) getrennt und fixiert. Anschließend wurde bei einer schrägen Haltung der Glasplatten die Sequenziergellösung (für ein kleines bzw. großes Gel) zwischen die Scheiben luftblasenfrei pipettiert. Ein Kamm wurde am oberen Ende des Gels eingesetzt und fixiert. Nach ca. einer Stunde in waagerechter Position war die Polymerisation abgeschlossen, das Gel konnte nun in den DNA-Sequencer (LI-COR® Modell 4000, MWG Biotech) gestellt werden. Die Tankbehälter am oberen und unteren Ende wurden mit 1x TBE gefüllt (10x TBE-Puffer 1:10 verdünnt mit a. bidest.), danach wurde die elektrische Verbindung hergestellt. Nach einem Vorlauf, in der der Laser justiert und fokussiert wurde (bei 45°C, 37 mA, 50 W und 1000 V beim kleinen Gel, bzw. 1500 V beim großen Gel), wurden die Taschen nach dem Entfernen des Kammes mit 1x TBE gespült. Anschließend wurden je 1,7 µl der sequenzierten DNA-Proben pro Tasche aufgetragen und die Elektrophorese bei 1500 W (bzw. 2000 W bei Verwendung des großen Gels) gestartet. Eine Elektrophorese dauerte bis zu 12 Stunden und konnte am Computer mit dem Programm Base ImageIR (siehe 2.6, Seite 75) ausgewertet werden.

## Arbeiten mit Proteinen

## 2.5.2.14 Herstellung von Proteinen

*LB-Medium (für E. coli):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
LB	2 % (w/v)	Pulver	20 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Ampicillinlösung	1 mg/ml	Lösung (50 mg/ml, siehe Seite 46)	2 ml

20 g LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren. Bei Verwendung ampicillinresistenter Bakterien nach dem Abkühlen 2 ml Ampicillinlösung hinzufügen.

*TSB-Medium (für E. coli Flexneri):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
TSB	3 % (w/v)	Pulver	30 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Ampicillinlösung	1 mg/ml	Lösung (50 mg/ml, siehe Seite 46)	2 ml

30 g TSB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren. Bei Verwendung ampicillinresistenter Bakterien nach dem Abkühlen 2 ml Ampicillinlösung hinzufügen.

*6x Proteinprobenpuffer (pH 6,8):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 18,8 ml
Serva Blue G	0,37 mM	Pulver (854 g/mol)	6 mg
Tris Base	27 mM	Pulver (121 g/mol)	63,35 mg
SDS	442 mM	Salz (288,4 g/mol)	2,4 g
a. bidest.			ad. 10 ml
HCl	Titrieren bis pH 6,8	Lösung (3 M)	
Glycerol	31,5 %ige Lösung (v/v)	100 %ige Lösung (v/v)	6 ml
2-Mercaptoethanol	15 % (v/v), 1,8 M	99% (v/v), (78 g/mol)	ca. 2,8 ml

63,35 mg Tris Base, 2,4 g SDS und 6 mg Serva Blue G in 10 ml a. bidest. lösen und mit HCl bis pH 6,8 titrieren. Den 10 ml wurden 6 ml Glycerol zupipettiert, die Lösung wurde steril filtriert (45 µm Poren) und zu je 850 µl aliquotiert. Kurz vor Gebrauch wurden jedem Aliquot 150 µl 2-Mercaptoethanol (unter dem Abzug) zupipettiert (kühl aufbewahren).

*10x PBS-Puffer (nach Dulbecco, pH 7,4, Verwendung als 1x PBS-Puffer):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Kaliumchlorid (KCl)	26,8 mM	Salz (74,55 g/mol)	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,7 mM	Salz (136,09 g/mol)	2 g
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	4,9 mM	Salz (203,30 g/mol)	1 g
Natriumchlorid (NaCl)	1,36 M	Salz (58,44 g/mol)	80 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	152 mM	Salz (141,96 g/mol)	21,6 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	Titrieren bis pH 7,4	Lösung (1 M)	
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	0,9 mM	Salz (111 g/mol)	0,1 g

KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ , NaCl und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 1000 ml a. bidest. lösen, danach mit NaOH bis zum pH 7,4 titrieren. Bei Bedarf die Lösung 1:10 mit a. bidest. verdünnen (1x Puffer) und 0,1 g  $\text{CaCl}_2$  pro Liter zugeben (würde vorher ausfällen).

<b>Zusätzlich verwendete Materialien</b>
Bakterienkolonie (z.B. <i>E. coli</i> oder <i>E. coli</i> Flexneri)
IPTG (Stocklösung 1 M)
Flüssiger Stickstoff

### Arbeitsschritte

Eine Bakterienkolonie wurde über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C in 10 ml LB (TSB bei *E. coli* Flexneri, mit Ampicillin bei bakterieller Resistenz) inkubiert. Bei Vorhandensein bestimmter Expressionsvektoren (z.B. pUC19) wurden 10 µl 1 M IPTG (Verhältnis 1:1000, 1 mM) als Induktor einer Proteinexpression zugegeben. Am nächsten Morgen wurde die Lösung 1:50 in 20 ml des gleichen Mediums verdünnt und zwei bis drei Stunden unter gleichen Bedingungen bis zu einer  $\text{OD}_{\lambda=600}$  von 0,8 am UV-Spektralphotometer inkubiert. 1 ml der bakteriellen Lösung wurde nach vorheriger Eichung mit einer Leerprobe (steriles Medium) gemessen. 1 OD entspricht ca.  $4 \times 10^8$  Bakterien/ml. Nach dem Zentrifugieren der bakteriellen Lösung (Tischzentrifuge Eppendorf 5415 c bei 4300 U/min über 10 min) und dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 300 µl eiskaltem 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 95°C gekocht und 15 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Eppendorf centrifuge 5402, 14000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde abgenommen, aliquotiert und in den Verhältnissen 1:2, 1:4 und 1:8 mit 1x PBS verdünnt. Nach dem Messen der Proteinkonzentration wurden pro 100 µl Protein/PBS-Gemisch 20 µl 6x Proteinprobenpuffer zugegeben. Vor dem Aufbewahren bei -20°C wurden die Proteine in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## 2.5.2.15 Messung von Proteinen

*Working Buffer (nach Bradford, bei Raumtemperatur einen Monat haltbar):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 500 ml
Ethanol	4,75 % (v/v)	100 %ige Lösung	23,75 ml
Phosphorsäure a. bidest.	10 % (v/v)	100 %ige Lösung	50 ml
Serva Blue G	0,08 mM	Pulver (854 g/mol)	ad. 500 ml
			35 mg

Vor Gebrauch wurde das Gemisch mit Whatman No.1 Papier filtriert.

Zusätzlich verwendete Materialien
BSA, gelöst in a. bidest. (20 mg/ml)
6x Proteinprobenpuffer (siehe Seite 62)
10x PBS-Puffer (siehe Seite 62)

### Arbeitsschritte

Bei allen Experimenten mit Proteinen musste streng auf Eis gearbeitet werden. Zunächst wurde eine für die Errechnung der Proteinkonzentration notwendige Proteinstandardkurve mit BSA erstellt. Dazu wurden in einer Messreihe sechs unterschiedliche BSA-Konzentrationen (0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg und 15 µg) in je 100 µl 1x PBS-Puffer gelöst und mit je 900 µl Working Buffer aufgefüllt. Nach einer Eichung mit einer Leerprobe (100 µl 1x PBS + 900 µl Working Buffer) wurde die Extinktion der sechs Proteinlösungen am UV-Spektralphotometer (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 580 \text{ nm}$  gemessen. Anschließend konnte bei bekannter Proteinkonzentration (C) und Extinktion (E) mit der Formel  $F = C/E$  der Berechnungsfaktor (F) ermittelt werden (zum Beispiel: 2 µg/ml BSA : 0,25  $OD_{\lambda=580} = 8 F$ ). Der Mittelwert aller sechs Berechnungsfaktoren der BSA-Proben (F') war für die Berechnung der Proteinkonzentration entscheidend. 1 µl einer Proteinprobe wurde zuvor in 100 µl 1x PBS und 900 µl Working Buffer gelöst, um anschließend die Extinktion der Lösung zu messen (UV-Spektralphotometer,  $\lambda=580 \text{ nm}$ ). Die erhaltene Extinktion (OD) wurde mit dem Berechnungsfaktor F' multipliziert, das Ergebnis entsprach der Proteinkonzentration in µg/µl. Anschließend wurde die Proteinprobe im Verhältnis 1:5 mit 6x Proteinprobenpuffer verdünnt und eingefroren.

### 2.5.2.16 Gelelektrophorese für Proteine

#### Proteingelpuffer (pH 8,45):

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 300 ml
SDS	17 mM	Salz (288,4 g/mol)	1,5 g
Tris Base	24,7 mM	Pulver (121 g/mol)	182 g
a. bidest.			ad. 300 ml
HCl	Titrieren bis pH 8,45	Lösung (3 M)	

182 g Tris Base und 1,5 g SDS in 300 ml a. bidest. lösen, mit HCl bis pH 8,45 titrieren und durch Cellulose-Acetat-Filter (Nalgene, Porengröße von 0,45 µm) filtrieren.

#### Trenngel 12,5 %:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 20 ml
Acrylamid: Bisacrylamid (29:1)	12,5 % (v/v)	40%ige Lösung in a. bidest. (v/v) (71 bzw. 154 g/mol)	6,25 ml
Proteingelpuffer	33 % (v/v)	100 %ige Lösung (siehe Seite 65)	6,66 ml
a. bidest.	25 % (v/v)		5 ml
Glycerol	10 % (v/v)	100 %ige Lösung	2 ml
TEMED	0,05 % (v/v)	100 %ige Lösung	10 µl
APS	0,05 % (v/v)	10 %ige Lösung	100 µl

TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen des Gels zugeben.

#### Sammelgel 4 %:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 10 ml
Acrylamid: Bisacrylamid (29:1)	4 % (v/v)	40%ige Lösung in a. bidest. (v/v) (71 bzw. 154 g/mol)	1 ml
Proteingelpuffer	25 % (v/v)	100 %ige Lösung	2,5 ml
a. bidest.	64 % (v/v)		6,4 ml
TEMED	0,07 % (v/v)	100 %ige Lösung	7 µl
APS	0,1 % (v/v)	10 %ige Lösung	100 µl

TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen des Gels zugeben.

#### Anodenpuffer (pH 8,9):

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 5000 ml
Tris Base	200 mM	Pulver (121 g/mol)	121 g
a. bidest.			ad. 5000 ml
Salzsäure (HCl)	Titrieren bis pH 8,9	Lösung (3 M)	

#### Kathodenpuffer:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Tris Base	100 mM	Pulver (121 g/mol)	12,1 g
Tricine	100 mM	Pulver (179 g/mol)	17,9 g
SDS	3,4 mM	Salz (288,4 g/mol)	1 g
a. bidest.			ad. 1000 ml

*Proteinstandardlösung (Gemisch 10 min bei 95°C kochen):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 30 µl
Proteinstandardmarker (Lösung)	10 % (v/v)	Molekulargewichtsmarkierungsstandard, Fluka, Dalton Mark VI L, Best.-Nr.69814	3 µl
6x Proteinprobenpuffer	1x Lösung	6x Lösung (siehe Seite 62)	5 µl
1x PBS-Puffer	0,73x Lösung	1x Lösung (siehe Seite 62)	22 µl

*Färbelösung:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 ml
Serva Blue G	0,58 mM	Pulver (854 g/mol)	50 mg
Ethanol	30 % (v/v)	100 %ige Lösung	30 ml
Essigsäure	10 % (v/v)	100 %ige Lösung	10 ml
a. bidest.			60 ml

*Fixierlösung:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 550 ml
Ethanol	27 % (v/v)	100 %ige Lösung	150 ml
Essigsäure	9 % (v/v)	100 %ige Lösung	50 ml
a. bidest.			350 ml

Zusätzlich verwendete Materialien
6x Proteinprobenpuffer (siehe Seite 62)
10x PBS-Puffer (siehe Seite 62)

Protein	Molekulargewicht in Dalton
Lysozym aus Hühnereiweiss	14 000
ss-Lactoglobulin aus Kuhmilch	18 400
Trypsinogen aus Rinderpankreas	24 000
Pepsin aus Schweinemagen	36 000
Albumin aus Hühnereiweiss	45 000
Albumin aus Rinderserum	67 000

Zusammensetzung des Standardproteinmarkers, Fluka

## Arbeitsschritte

Pro Gel wurden zwei Glasplatten (eine ist ca. 1 cm höher als die andere), zwei Spacer (Dicke 1,5 mm) und ein Gummistreifen mit a. bidest. und Ethanol gereinigt. Die beiden Platten wurden dann – seitlich durch die Spacer getrennt – in eine Fassung eingespannt. Auf dem Gummistreifen, der als Boden das Auslaufen verhindern sollte, wurde die Fassung in Kammer 1 (Aufbaukammer) eingepasst. Zwischen die beiden Scheiben wurde das Trenngel bis ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes der kleineren Scheibe einpipettiert (ca. 10 ml pro Gel). Auf das

Trenngel wurde a. bidest. bis zum Rand der kleineren Scheibe pipettiert, damit das Trenngel geradlinig polymerisiert. Nach dem Entfernen des Wassers nach ca. 1 Stunde wurde das Sammelgel (ca. 5 ml pro Gel) auf das polymerisierte Trenngel bis zum oberen Rand pipettiert. Anschließend wurde ein Kamm eingesetzt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels (ca. 45 min) wurden die Gelfassung aus der Kammer 1 entnommen und zusammen mit einer parallel vorbereiteten zweiten Gelfassung in Kammer 2 eingefügt. Dabei bildeten die Gele die Seitenwände einer nach oben offenen Kammer, die bis zum oberen Rand mit Kathodenpuffer gefüllt wurde. Nach dem Entfernen der Kämmen wurden die Geltaschen mit Kathodenpuffer gespült. Anschließend wurde Kammer 2 in eine Kammer 3 gehängt, die mit Anodenpuffer gefüllt wurde. Nun wurden in jede Geltasche 30 µl Proteinproben aufgetragen. Eine Tasche wurde mit 30 µl Proteinstandardlösung gefüllt. Danach wurde ein Deckel auf Kammer 3 gesetzt und mit einer Stromquelle (BIORAD Powerpac 3000) verbunden. Die Gelelektrophorese dauerte zwei Stunden bei konstanten 100 V (ca. 160 mA). Die Proteinbanden der Gele konnten anschließend angefärbt oder im Western Blot dargestellt werden. Das unspezifische Anfärben erfolgte durch einminütiges Schwenken in einer Färbelösung. Zur Visualisierung der Banden wurde das Gel mit Fixierlösung entfärbt.

#### 2.5.2.17 Western Blot

##### *Transferpuffer:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Glyzin	190 mM	Pulver (75 g/mol)	14,4 g
Tris Base	24,7 mM	Pulver (121 g/mol)	3 g
Ethanol	20 % (v/v)	100 %ige Lösung	200 ml
a. bidest.			ad. 1000 ml

Zusätzlich verwendete Materialien
Elektrophoresegel mit Proteinen
Eis
Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 83, Schleicher und Schüll, Best.-Nr. 414594)
Gel-Blotting-Papier (GB 004, Schleicher und Schüll, Best.-Nr. 426972)

## Arbeitsschritte

Zwei auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene Blotting-Papierstücke und die Membran wurden mit gekühltem Transferpuffer durchtränkt. Auf die schwarze Seite (Kathode) der Western-Blot-Kammer wurden nacheinander Kunststofffilz, Blot-Papier, Gel, Membran, das andere Blot-Papier und ein weiterer Kunststofffilz luftblasenfrei übereinander gelegt. Die Kammer wurde mit der roten Seite (Anode) geschlossen und in eine Tankkammer gestellt, die mit Transferpuffer gefüllt wurde. Anschließend wurde ein Kühleinsatz in die Kammer eingepasst. Die Kammer wurde in eine Schale mit Eiswasser gestellt, welche die Kammer von außen kühlen sollte. Der Blot-Vorgang dauerte eine Stunde bei konstanten 100 V (ca 240 mA) (BIORAD Powerpac 3000), danach konnte die Membran mit den transferierten Proteinen entnommen werden.

### 2.5.2.18 Proteindarstellung auf einer Membran mittels Antikörper (Western Blot)

*Tween-TSB-Puffer (TTSB, pH 7,5):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Natriumchlorid	0,5 M	Salz (58,4 g/mol)	29,2 g
Tris Base	3,5 mM	Pulver (121 g/mol)	423 mg
a. bidest.			ad. 1000 ml
Tween 20	0,2 % (v/v)	100 %ige Lösung	2 ml

*Magermilchlösung:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 ml
Magermilchpulver	10 % (w/v)	Pulver	10 g
Tween-TSB-Puffer	98 % (v/v)	100 %ige Lösung (siehe Seite 68)	98 ml
Natriumazid	0,02 % (v/v)	1 %ige Lösung	2 ml

*Detektionslösung*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 4,5 ml
3-Aminophtalazin (Luminol)	0,25 % (w/v)	Pulver	11,25 µg



4-Jodophenol	0,3 % (w/v)	Pulver	13,5 µg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (Wasserstoffperoxid)	0,03 % (v/v)	3 %ige Lösung	45 µl
DMSO	40 % (v/v, ca. 5 M)	100 %ige Lösung (78,13 g/mol)	1,8 ml
Tris-Cl	50 mM (pH 7,5)	Tris-Lösung (1 M), titriert mit HCl (3 M) bis pH 7,5	225 µl
a. bidest.			ad. 4,5 ml

*Amidoschwarzlösung:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 100 ml
Amidoschwarz	0,01 % (w/v)	Pulver	10 µg
a. bidest.			ad. 100 ml

Zusätzlich verwendete Materialien
Western-Blot-Nitrozellulosemembran mit transferierten Proteinen
BSA-Pulver (0,3 g)
Primärantikörper (z.B. monoclonaler Anti-Penta-His-Antikörper mouse oder polyclonaler Anti-GST-Z5-Antikörper rabbit, Santa Cruz, Best.-Nr.SC-459, Seite 36)
Sekundärantikörper (z.B. Anti-Mouse-POD-Ak oder Anti-Rabbit-POD-Ak, Seite 36)
100 % Glycerol
Film (Kodak, X-omat LS, Bestnr.791034)
Klarsichtfolie
100 % Essigsäure

## Arbeitsschritte

Die Western-Blot-Membran wurde über Nacht in 100 ml Magermilchlösung auf dem Schwenker inkubiert. Diese sollte unspezifische Proteine abpuffern. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit 20 ml Tween-TSB-Puffer (TTSB) gewaschen. Alle Wasch- oder Inkubationsvorgänge erfolgten auf dem Schwenker. Anschließend wurde die Membran eine Stunde mit einem Primärantikörper inkubiert. Bei Verwendung von pUC19-Konstrukten wurden 0,75 µl Anti-Penta-His-Antikörper (mouse) in einer Verdünnung von 1:20000 zu 15 ml TTSB pipettiert, nachdem zuvor 0,3 g BSA-Pulver im Puffer gelöst wurden. Bei Verwendung von pGEX6P2 wurden 0,26 µl Anti-GST-Antikörper (rabbit) 1:60000 in 15 ml TTSB gelöst. Danach schlossen sich 4 Waschschrte mit je 20 ml TTSB an, ehe die Membran eine Stunde mit einem

Sekundärantikörper inkubiert wurde. Je nach Primärantikörper wurden entweder 1,5 µl Anti-Mouse-POD-Antikörper (1:2 in Glycerol verdünnt) in 15 ml TTSB gelöst (Verdünnung 1:20000, bei pUC19), oder es wurden 5 µl Anti-Rabbit-POD-Antikörper 1:3000 in 15 ml TTSB verdünnt (pGEX6P2). Anschließend wurde wieder mit Hilfe von vier Waschschritten mit je 20 ml TTSB gewaschen. Die Membran wurde danach 90 sec mit 4,5 ml Detektionslösung betropft. Dabei reagierte die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase (POD) mit dem Wasserstoffperoxid der Detektionslösung. Die Membran wurde leicht abgetupft, mit Klarsichtfolie überdeckt und 30 sec, 2 min und 5 min in der Dunkelkammer mit einem Film (Kodak, X-omat LS) bedeckt, der durch die lumineszierende Reaktion belichtet wurde. Nach der Entwicklung der Filme in der Dunkelkammer wurde die Klarsichtfolie wieder entfernt. Die Membran wurde 1 min in 100 ml Amidoschwarzlösung angefärbt und danach 3 min in einer 20 % Essigsäurelösung (Essigsäure 1:5 verdünnt in a. bidest.) entfärbt. Danach konnten die Banden des Films mit den Proteinbanden der Proben und des Proteinstandards auf der Membran verglichen werden.

## Arbeiten mit Lipopolysacchariden (LPS)

### 2.5.2.19 Herstellung von Lipopolysacchariden

mit der Proteinase K-Methode nach Hitchcock et al. (61)

*Lyse-Puffer (pH 6,8):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 5 ml
SDS	68 mM (2 %)	10 %ige Lösung (0,34 M)	1 ml
Glycerol	10 % (v/v)	100 %ige Lösung	500 µl
Tris-Cl	1 M, pH 6,8	Tris-Lösung (5 M), titriert mit HCl (3 M) bis pH 6,8	1 ml
2-Mercaptoethanol	4 % (v/v), 0,5 M	99 %ige (v/v), 78 g/mol	200 µl
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)	Pulver	20 µg
a. bidest.			ad. 5 ml

*LB-Medium (für E. coli):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
LB	2 % (w/v)	Pulver	20 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Ampicillinlösung	1 mg/ml	50 mg/ml, s. Seite 46	2 ml

20 g LB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren. Bei Verwendung ampicillinresistenter Bakterien nach dem Abkühlen 2 ml Ampicillinlösung hinzufügen.

*TSB-Medium (für E. coli Flexneri):*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
TSB	3 % (w/v)	Pulver	30 g
a. bidest.			ad. 1000 ml
Ampicillinlösung	1 mg/ml	50 mg/ml, s. Seite 46	2 ml

30 g TSB-Pulver in einem Liter a. bidest. lösen und bei 121°C über 15 min autoklavieren. Bei Verwendung ampicillinresistenter Bakterien nach dem Abkühlen 2 ml Ampicillinlösung hinzufügen.

*Proteinase-K-Puffer:*

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 200 ml
Proteinase K	0,25 % (w/v), (ca. 0,6 U/ml)	Pulver (Tritirachium album, Fluka, Best.- Nr. 82495, 234 U/mg)	0,5 g
Lyse-Puffer		Lösung (siehe Seite 70)	ad. 200 ml

**Arbeitsschritte**

Die gewünschte Bakterienkultur wurde in 10 ml LB (TSB bei *E. coli* Flexneri, mit Ampicillin bei bakterieller Resistenz) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung 1:50 mit 10 ml des gleichen Mediums verdünnt. Die Bakterien wurden ca. 3 Stunden inkubiert, bis die Messung der Lösung am UV-Spektralphotometer (Pharmacia) eine OD 0,7 (Wellenlänge  $\lambda = 600$  nm) ergab, nachdem das Gerät zuvor mit dem sterilen Medium geeicht wurde. Danach wurden 3 ml der Bakterienlösung abpipettiert und 5 min bei 4000 U/min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 50  $\mu$ l Lyse-Puffer gelöst und 10 min bei 100°C im Wärmeblock gekocht. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 10  $\mu$ l Proteinase K-Lösung zugesetzt. Der Ansatz wurde eine Stunde in den Wärmeblock bei 60°C gestellt. Anschließend wurde die Lösung mit 540  $\mu$ l Lyse-Puffer 1:10 verdünnt. 30  $\mu$ l dieser Verdünnung enthielten Lipopolysaccharide (LPS) von ca.  $7 \times 10^5$  Bakterien.

### 2.5.2.20 Gelelektrophorese nach Laemmli

#### Separationsgel nach Laemmli (pH 8,8):

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 15 ml
Acrylamid: Bisacrylamid (29:1)	15 % (v/v)	40 %ige Lösung (71 bzw. 154 g/mol)	5,625 ml
Tris-Cl	0,375 M, pH 8,8	Tris-Lösung (1,5 M), titriert mit HCl (3 M) bis pH 8,8	3,75 ml
SDS	3,4 mM (0,1 %)	10 %ige Lösung (0,34 M)	150 µl
TEMED	0,06 % (v/v)	100 %ige Lösung	10 µl
APS	0,33 % (v/v)	10 %ige Lösung	50 µl

Kurz vor Gebrauch 10 µl TEMED und 50 µl APS zugeben.

#### Sammelgel nach Laemmli (pH 6,8):

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 5 ml
Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	5,2 % (v/v)	40 %ige Lösung (71 bzw. 154 g/mol)	650 µl
Tris-Cl	0,25 M	Tris Base (1 M), titriert mit HCl (3 M) bis pH 6,8	1,25 ml
SDS	3,4 mM (0,1 %)	10 %ige Lösung (0,34 M)	50 µl
TEMED	0,1 % (v/v)	100 %ige Lösung	5 µl
APS	0,05 % (v/v)	10 %ige Lösung	25 µl

Kurz vor Gebrauch 5 µl TEMED und 25 µl APS zugeben.

#### Elektrophoresepuffer nach Laemmli:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Tris Base	0,025 M	Pulver (121 g/mol)	3 g
Glyzin	190 mM	Pulver (75 g/mol)	14,4 g
SDS	3,4 mM	Salz (288 g/mol)	1 g
a. bidest.			ad 1000 ml

### Arbeitsschritte

Der Aufbau der Elektrophoresekammer entsprach der aus der Proteingelelektrophorese aus Kapitel 2.5.2.16 (Seite 65), wobei zwischen die beiden Scheiben zunächst das Separationsgel nach Laemmli bis ca. 2 cm unterhalb der kleineren Scheibe einpipettiert wurde. Nach der Polymerisation des Separationsgels wurde der Scheibenzwischenraum bis zum oberen Rand der

kleineren Scheibe mit dem Sammelgel nach Laemmli gefüllt. Nach dem Einhängen der Elektrophoresekammer in eine Pufferkammer wurden beide Kammern mit einem Elektrophoresepuffer nach Laemmli gefüllt. Anschließend wurde nach dem Polymerisieren des Sammelgels der zuvor eingeführte Kamm herausgezogen, die Geltaschen wurden mit Elektrophoresepuffer gespült, um danach mit je 30 µl LPS-Proben gefüllt zu werden. Die Elektrophorese dauerte ca. 2,5 Stunden bei konstanten 35 mA (ca. 70 V und 2 W, Biorad Powerpac 3000), danach wurde das Gel entnommen und bearbeitet.

#### 2.5.2.21 Darstellung von LPS mittels Silberfärbung

##### LPS-Fixierlösung:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 1000 ml
Isopropanol	25 % (v/v)	100 %ige Lösung	250 ml
Essigsäure	7 % (v/v)	100 %ige Lösung	70 ml
a. bidest.			ad. 1000 ml

##### Lösung für Silberfärbung:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 140 ml
NaOH	0,02 M	Lösung (1 M)	2,8 ml
Silbernitrat	42 mM (0,714 % w/v)	Pulver (170 g/mol)	1 g
Ammoniumhydroxid	ca. 0,2-0,3% (v/v)	29,4 %ige Lösung	ca. 1,5 ml

1 g Silbernitrat in 135 ml a. bidest. und 2,8 ml NaOH 1 M lösen, anschließend unter Rühren mit Ammoniumhydroxid titrieren, bis die Lösung farblos ist (ca. 1,5 ml, unter dem Abzug!).

##### LPS-Entwicklerlösung:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 2500 ml
Zitronensäure	0,0001 M	Pulver (192 g/mol)	50 mg
Formaldehyd	0,0074 % (v/v)	37 %ige Lösung	0,5 ml
a. bidest.			ad. 2500 ml

50 mg Zitronensäure in 2499,5 ml a. bidest. lösen und 0,5 ml Formaldehyd zugeben.

##### Perjodsäurelösung:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 150 ml
Perjodsäure	0,03 M	Pulver (227,9 g/mol)	1 g
a. bidest.			146 ml

1 g Perjodsäurepulver in 146 ml a. bidest. lösen und 4 ml LPS-Fixierlösung zugeben.

##### Stopbad:

Substanz	Endkonzentr.	Stock	Menge auf 200 ml
Essigsäure	0,35 % (v/v)	100 %ige Lösung	700 µl
a. bidest.			199,3 ml

### **Arbeitsschritte**

Alle Arbeitsschritte wurden auf dem Schwenker durchgeführt.

Das Gel der Laemmli-Elektrophorese wurde über Nacht in 200 ml LPS-Fixierlösung inkubiert und am nächsten Morgen 5 min in 150 ml Perjodsäurelösung oxidiert. Danach wurde das Gel gründlich in acht zwanzigminütigen Waschschritten mit je 200 ml a. bidest. umspült, ehe es 10 min in 150 ml einer Lösung für Silberfärbung inkubiert wurde. Danach wurde das Gel in einen neuen Behälter überführt und mit a. bidest. 4 x 10 min gewaschen. Anschließend wurde das Gel unter Beobachtung ca. 5 min in 250 ml Entwicklerlösung bei Raumtemperatur geschwenkt. Sobald die Banden in gewünschter Helligkeit und zufriedenstellendem Kontrast zu sehen waren, wurde das Gel 30 min in 200 ml Stopbad fixiert. Danach wurde das Gel ein letztes Mal mit 200 ml a. bidest. gewaschen und konnte sowohl eingescannt, als auch in Frischhaltefolie aufbewahrt werden.

## 2.6 Computerprogramme

Tabelle 8 Computerprogramme

Aufgelistet sind alle in dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme:

Programm	Verwendungszweck
Bildbearbeitungsprogramme: adobe Photoshop und Corel Photo Paint	Bearbeitung der Grafiken und Abbildungen dieser Arbeit (z.B. Abbildung 1, S. 79).
Gendatenbanken: embl/, GenBank	Sequenzvergleich von Genen (z.B. <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> )
HUSAR: Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources (siehe 2.5.2.8, Seite 53)	Bearbeitung von Gensequenzen und Proteinen (z.B. Bearbeitung von Sequenzierungsergebnissen, Suche nach Schnittstellen, Triplet-Muster).
IBM OS/2 Base ImageIR Software mit den Programmteilen Data Collection und Image Base Analysis für die DNA-Sequenzierung (siehe 2.5.2.13, Seite 58)	Auswertung von Sequenzierungsergebnissen.
Microsoft Word und Excel für Windows 97, 2000 und XP.	Textverarbeitungsprogramme dieser Arbeit.
Zeichenprogramm Corel Draw 9	Erstellung von Grafiken dieser Arbeit (z.B. Grafik 7, S. 34).

### 3 Ergebnisse

Für eine Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit, ob und welche phänotypischen Auswirkungen in Form einer Veränderung des LPS-Musters durch eine Integration von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* Flexneri (SF) Serogruppe 6 hervorgerufen werden, sind unterschiedliche Vorgehensweisen möglich. Eine Integration von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF Serogruppe 6, welcher als Wildtyp nicht im Besitz des Gens ist, erfordert ein Einschleusen von *cld<sub>pHS-2</sub>* in die Zellen und einen stabilen Verbleib. Dabei kann versucht werden, das gesamte pHS-2-Plasmid oder nur das *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gen aus pHS-2 in SF Serogruppe 6 zu integrieren. Wir entschieden uns für einen isolierten Transfer von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF Serogruppe 6, um die spezifischen phänotypischen Auswirkungen des Gens auswerten zu können. Eine komfortable Methode für einen Gentransfer stellt die Benutzung von synthetischen Expressionsvektoren dar. Diese besitzen neben geeigneten Schnittstellen in der „multiple cloning site“ (MCS), die das Klonieren von Genen vereinfachen, eigene Ribosomen-Bindungsstellen und Promotoren mit hoher Expressionsleistung. Außerdem vermitteln die Vektoren oftmals eine Ampicillinresistenz, die den stabilen Verbleib der Vektoren in Ampicillin-sensiblen Bakterien unter Verwendung Ampicillin-haltiger Medien erleichterte. Mit Hilfe der Vektoren war eine Integration von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF-Wildtypen möglich, ohne dass das übrige genetische Material der Bakterien manipuliert wurde. Die Vektoren können z. B. über eine Transformation in die Bakterien eingeschleust werden, ohne dass es zu sonstigen Veränderungen der chromosomalen oder episomalen DNA der Bakterien kam.

Es stellte sich jedoch die Frage, auf welche Art und Weise *cld<sub>pHS-2</sub>* in die Vektoren eingebaut werden könnte und welche Vektoren besonders geeignet wären. Bei einer großen Auswahl an Expressionsvektoren wählten wir die in ihrer Struktur relativ ähnlichen pUC19 und pBluescriptKS<sup>+</sup> aus, mit denen positive Erfahrungen bei verschiedenen Experimenten mit



Expressionsleistungen in SF gesammelt worden waren (siehe 4.1.2, Seite 110). Beide Vektoren vermitteln eine Ampicillin-Resistenz und besitzen eine MCS, die von einem Promotor  $P_{lac}$  bzw.  $P_{T3}$  und dem Gen  $lacZ$  umgeben wird. Der Einbau von  $cld_{pHS-2}$  über zwei Schnittstellen in die MCS hatte mehrere Vorteile. Zum einen sollten  $P_{T3}$  und  $P_{lac}$ , die sich so vor dem Startcodon von  $cld_{pHS-2}$  befanden, die Expression des eingeschleusten Gens steuern. Eine von  $P_{lac}$  ( $P_{T3}$ ) initiierte Expression in pUC19 (pBluescriptKS+) ist durch IPTG induzierbar, was von besonderem Vorteil ist, da  $Cld_{pHS-2}$  mit hoher Expressionsleistung gebildet werden kann. Das wiederum erleichterte den Nachweis des exprimierten Enzyms als Voraussetzung für die Untersuchung des LPS-Musters. Um eine isolierte Expression von  $cld_{pHS-2}$  zu gewährleisten, musste eine Expression als Fusionsprotein mit  $lacZ$ , einem der MCS benachbarten Gen, vermieden werden. Dazu wurde  $cld_{pHS-2}$  in einem anderen Leseraster als  $lacZ$  in die MCS integriert („out of frame“). Zusätzlich sollte ein Stopcodon am Ende von  $cld_{pHS-2}$  die Transkription beenden. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, wurden zwei „out of frame“-Konstrukte pBlue- $cld_{pHS-2}$ -out (pBluescriptKS+) und pUC19- $cld_{pHS-2}$ -out erstellt (siehe 3.1.1, Seite 78).

Neben der Analyse des isoliert exprimierten  $Cld_{pHS-2}$  und seinem Einfluss auf das LPS-Muster in SF Serogruppe 6 war es interessant, herauszufinden, welchen Einfluss  $Cld_{pHS-2}$  als Fusionsprotein auf phänotypische Veränderungen in SF Serogruppe 6 besaß. Um eine Expression als Fusionsprotein zu erwirken, sollte ein weiterer Vorteil von Expressionsvektoren genutzt werden, indem das zumeist zur MCS benachbarte Gen zusammen mit  $cld_{pHS-2}$  exprimiert werden sollte. Dafür musste  $cld_{pHS-2}$  im gleichen Leseraster wie das zur MCS benachbarte Gen (z.B.  $lacZ$  oder  $gst$ ) in die MCS des Expressionsvektors ohne dazwischenliegendes Stopcodon integriert werden („in frame“, siehe Kapitel 3.2, Seite 99).

Wir begannen unsere Experimente mit der Erstellung und Analyse der „out of frame“-Konstrukte pBlue- $cld_{pHS-2}$ -out und pUC19- $cld_{pHS-2}$ -out, um eine Expression von  $cld_{pHS-2}$  als

Einzelprotein zu erwirken. Anschließend sollte der Einfluss von  $\text{Cld}_{\text{pHS-2}}$  auf das LPS-Muster untersucht werden.

### 3.1 Arbeiten mit „out of frame“-Konstrukten

#### 3.1.1 pBlue- $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$ -out und pUC19- $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$ -out

##### 3.1.1.1 Erstellung der Konstrukte

Bei der Erstellung der Konstrukte pBlue- $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$ -out (pBluescriptKS+) und pUC19- $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$ -out mussten gewisse Anforderungen erfüllt werden. Die Schnittstellen innerhalb der MCS der Vektoren, über die  $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$  als Insert in den Vektor integriert werden sollte, mussten zur Vermeidung von Fusionsproteinen so gewählt werden, dass sich das Gen „out of frame“ (nicht im gleichen Leseraster) zum nachfolgenden *lacZ*-Gen befand. Außerdem war es notwendig, zusätzlich zu  $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$  eine Erkennungssequenz zu integrieren. Dieses Antigen sollte von Antikörpern spezifisch gebunden werden, um eine Lumineszenz-Reaktion in Gang zu setzen, wodurch eine Expression von  $\text{Cld}_{\text{pHS-2}}$  nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Voraussetzung war, dass Anfang und Ende der Nukleotidsequenz ( $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$  plus Erkennungssequenz) durch ein Start- und Stopcodon (ATG bzw. TGA) gekennzeichnet sind und von den bakteriellen Polymerasen erkannt werden.

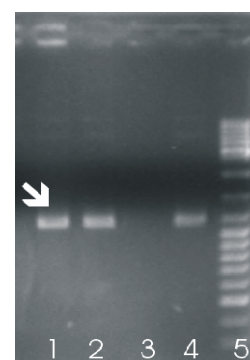
Um den genannten Erfordernissen zu genügen, wurden zwei Oligonukleotide erstellt (Oligonukleotid 1 und 2, Seite 39), die als PCR-Primer  $\text{cld}_{\text{pHS-2}}$  aus pHS-2 amplifizieren sollten. Beide Oligonukleotid-Primer wurden außen von geeigneten Schnittstellen (BamHI und PstI) begrenzt. Oligonukleotid 1 besaß zudem eine Erkennungssequenz, welche sich zwischen einem Startcodon und den ersten Nukleinsäuren des Gens befand. Die Erkennungssequenz bestand aus sechs Tripletts, die für sechs Histidine kodierten und als Antigen für Penta-His-Antikörper fungieren sollten.

Das PCR-Produkt der beiden Oligonukleotide mit pHS-2 als template-DNA (nach Plasmidpräparation einer Übernachtskultur des Wildtyps S279, SF Serogruppe 2a aus der Stammsammlung Adam, Seite 35) konnte nach einer Aufreinigung gelelektrophoretisch dargestellt werden (siehe Abbildung 1, Seite 79). Es konnte aufgrund seiner Länge (ca. 1100 bp) im Vergleich zum DNA-Marker (Seite 39) als *cld<sub>pHS-2</sub>* identifiziert werden. Die Methodik kann in dem Kapitel 2.5.2 (Seiten 46ff.) nachvollzogen werden.

Abbildung 1 PCR-Produkt *cld<sub>pHS-2</sub>*

Elektrophoretische Kontrolle des PCR-Produkts *cld<sub>pHS-2</sub>* (↙, Annealing temp 47°C, 20 Zyklen), von links nach rechts:

- Spur 1: PCR von S279 mit den Oligonukleotiden 1 und 7 (*cld<sub>pHS-2</sub>*-5-in/outframe und *cld<sub>pHS-2</sub>*-3-inframe)
- Spur 2: PCR von S279 mit den Oligonukleotiden 1 und 2 (*cld<sub>pHS-2</sub>*-5-in/outframe und *cld<sub>pHS-2</sub>*-3-outframe)
- Spur 3: PCR von S278 (SF Serogruppe 6) mit den Oligonukleotiden 1 und 2 (*cld<sub>pHS-2</sub>*-5-in/outframe und *cld<sub>pHS-2</sub>*-3-outframe, Negativkontrolle)
- Spur 4: PCR von S259 (SF Serogruppe 2a) mit den Oligonukleotiden 1 und 2 (*cld<sub>pHS-2</sub>*-5-in/outframe und *cld<sub>pHS-2</sub>*-3-outframe, Positivkontrolle)
- Spur 5: Gene Ruler Ladder Mix DNA-Marker



Anschließend wurde das PCR-Produkt, das aus den Oligonukleotiden 1, 2 und dem dazwischenliegenden *cld<sub>pHS-2</sub>* bestand, für die Ligation vorbereitet. Dazu wurden die beiden Schnittstellen BamHI und PstI, die das PCR-Produkt an den jeweiligen Enden begrenzten, geöffnet (Methodik Seite 53). Parallel wurden innerhalb der MCS des präparierten und gereinigten Vektors pBluescriptKS+ (Stammsammlung Labor Adam Nr.35, aus *E. coli* JM83, Methodik Seiten 46ff) die gleichen Schnittstellen aufgetrennt und dephosphoryliert (Seite 55). Anschließend konnte das Insert (PCR-Produkt) über eine Ligation „out of frame“ in pBluescriptKS+ kloniert werden (Seiten 56 und Grafik 9, Seite 80).

Mit dem Ligationsprodukt (pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out, 4106 bp) wurden kompetente *E. coli* DH5α (siehe 2.5.1.1, S. 41) erfolgreich transformiert (Ergebnis nicht dargestellt, auf Datenträger gespeichert). Die korrekte Sequenz des *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gens in pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out wurde mit einer

Sequenzierreaktion (siehe Hinweistext 1, S. 81) geprüft. Eine Nukleinsäure (Position 171 des Gens, Cytosin statt Thymin) des Gens unterschied sich von der beschriebenen Sequenz in der Gendatenbank (siehe 2.6, S. 75). Der dadurch hervorgerufene Aminosäureaustausch von Serin zu Prolin war in der Arbeitsgruppe Adam (Moussa Abba, nicht veröffentlicht) bereits bekannt und gilt als Normvariante.

Für die Konstruktion des Vektors pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out wurde pUC19 (aus *E. coli* DH5 $\alpha$ , Stammsammlung Labor Adam Nr. 358) wie zuvor pBluescriptKS+ mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI geöffnet und dephosphoryliert (Seiten 46ff.). Das sequenzierte *cld<sub>pHS-2</sub>* wurde mit BamHI und PstI aus pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out geschnitten, über eine Elektrophorese vom Restvektor getrennt, aus dem Gel extrahiert und als Insert über eine Ligation in pUC19 kloniert (Methodik ab Seite 50). Das Ligationsprodukt (pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out, 3813 bp, siehe

Grafik 9, S. 80) wurde nach seiner Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  mit Hilfe einer Restriktion (BamHI und PstI) und Elektrophorese auf den Besitz von *cld<sub>pHS-2</sub>* überprüft (siehe Abbildung 2, S. 81).

Grafik 9 Konstrukte pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out

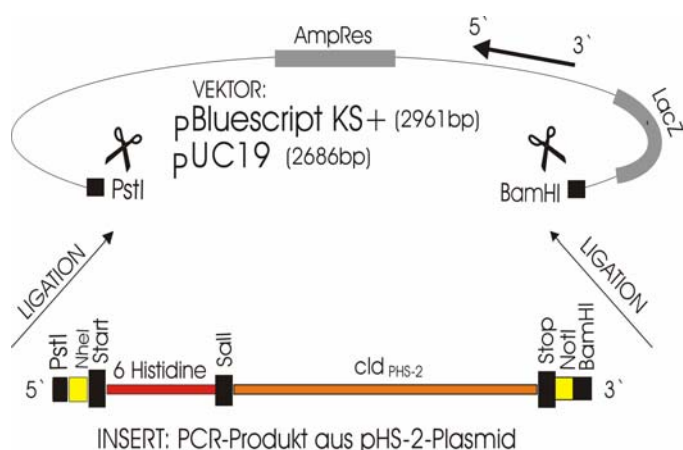
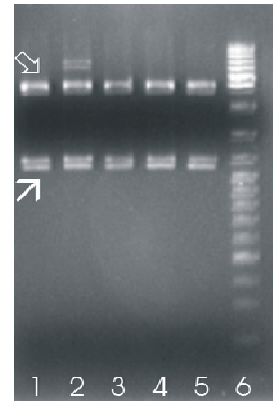


Abbildung 2 pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out in *E. coli* DH5 $\alpha$

Elektrophoretische Kontrolle von 5 *E. coli* DH5 $\alpha$ -Klonen mit pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out, geschnitten mit BamHI und PstI nach vorrangegangener Plasmidpräparation, von links nach rechts: Spuren 1 bis 5: Klone 1 bis 5  
Spur 6: Gene Ruler Ladder Mix DNA-Marker  
Die kürzere Bande zeigt das Insert *cld<sub>pHS-2</sub>* (1145 bp,  $\nearrow$ ), die längere den Restvektor pUC19 (2668 bp,  $\searrow$ ). Bei Klon 2 ist noch eine längere Bande (ca. 3800 bp) zu sehen, die dem ungeschnittenen Vektor pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out entsprach. Die Doppelbanden entsprechen weiteren Denaturierungsprodukten durch die Enzyme.



Hinweistext 1	Sequenzierreaktion von pBlue- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -out
Die Sequenzierung (Seite 58) wurde mit dem forward Primer M 13 und dem reverse Primer Uni-rev durchgeführt (siehe 2.4, S. 39), die kurz vor und nach der MCS von pBluescriptKS+ ansetzten. Dabei wurden drei Klone aus oben beschriebener Ligationsreaktion sequenziert. Klon 1 entsprach einem Religationsklon, bei Klon 2 war die Sequenz bei ca. 200 fehlenden Basen unvollständig. Das Sequenzierergebnis des dritten Klones (pBlue- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -out) ist aufgrund seines Umfangs nicht dargestellt (im Analysis-Programm, siehe 2.6, S. 75, auf Datenträgern gespeichert). Es entsprach der korrekten Sequenz von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> (kloniert in die PstI- und BamHI-Schnittstellen der MCS von pBluescriptKS+) inklusive oben beschriebener Variante einer Base (Cytosin statt Thymin an Position 938 von pHS-2) verglichen mit der Gendatenbank: emb1/ (M25995, siehe 2.6, Seite 75).	

### 3.1.1.2 Transformation in *E. coli* Flexneri (SF)

Nach der erfolgreichen Konstruktion von pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out war es notwendig, die Vektoren in SF zu transferieren, um Aussagen über einen Einfluss von Cld<sub>pHS-2</sub> auf das LPS-Muster von SF treffen zu können. Dazu sollten die Konstrukte über eine Transformation in SF geschleust werden. Da im Labor zwei Methoden existierten, um kompetente Bakterien herzustellen (unter Verwendung von CaCl<sub>2</sub> und RbCl, siehe 2.5.1.1 und 2.5.1.2, Seiten 41, 42), musste zunächst eruiert werden, welche Methode für die zu transformierenden Wirtszellen geeignet war.

Deshalb wurden Transformationsexperimente (siehe 2.5.1.3, S. 43) mit pUC19 und pBluescriptKS+ in *E. coli* DH5 $\alpha$  und SF Serogruppe 6 (S278, Stammsammlung Adam, siehe S. 35) durchgeführt. Dabei wurden kompetente Bakterien der CaCl<sub>2</sub>- und RbCl-Methode verglichen. Die Transformationsergebnisse unter Verwendung kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  beider

Methoden zeigten keine qualitativen Unterschiede (siehe Tabelle 9, S. 82). Daher wurden bei Transformationsexperimenten in *E. coli* DH5 $\alpha$  (z.B. 3.1.1.1, S. 78) kompetente Zellen der CaCl<sub>2</sub>-Methode bevorzugt, da die Herstellung weniger aufwendig war. Bei SF Serogruppe 6 (S278) waren die Transformationsresultate unter Verwendung RbCl-kompetenter Zellen im Vergleich zu CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen deutlich überlegen (siehe Tabelle 10, S. 82) Deshalb wurden bei den Transformationsexperimenten in SF RbCl-kompetente Zellen verwendet.

Tabelle 9 Vergleich CaCl<sub>2</sub>- und RbCl-kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$

Platte	150 $\mu$ l kompet. <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ RbCl	CaCl <sub>2</sub>	Menge an Vektor pBluescriptKS+ in $\mu$ g	Kolonien auf LB/Amp-Platten nach 24h
1	X		0,32 $\mu$ g	>300
2	X		0,04 $\mu$ g	>300
3	X		0,004 $\mu$ g	45
4		X	0,32 $\mu$ g	>300
5		X	0,04 $\mu$ g	>300
6		X	0,004 $\mu$ g	42
7	X		-	-
8		X	-	-

Tabelle 10 Vergleich CaCl<sub>2</sub>- und RbCl-kompetenter SF Serogruppe 6 (278)

Platte	150 $\mu$ l kompet.SF Gr. 6 RbCl	CaCl <sub>2</sub>	150 $\mu$ l komp. <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Menge an pUC19 in $\mu$ g	Menge an pBlue- scriptKS+ in $\mu$ g	Kolonien auf LB/Amp.Platte
1	X			0,4	-	36
2	X			3	-	190
3	X			-	3	166
4		X		0,4	-	-
5		X		3	-	2
6		X		-	3	-
7			X	3	-	>300
8			X	-	3	>300
9	X			-	-	-
10		X		-	-	-
11			X	-	-	-

Die beabsichtigte Verwendung der Vektoren pUC19 und pBluescriptKS+ setzte voraus, dass die Wirtszellen selbst Ampicillin-empfindlich waren. Beide Vektoren können nach Transformation den Wirtszellen eine Ampicillinresistenz vermitteln. Bei *E. coli* DH5 $\alpha$  war eine Ampicillinsensibilität bekannt, während viele Wildtyp-Stämme unterschiedlicher SF-

Serogruppen aus der Stammsammlung im Labor Adam (siehe 2.1, S. 35) Ampicillin-resistent waren (siehe Tabelle 11, S. 83). Deshalb wurden die SF-Wildtyp-Stämme auf ihr Resistenzverhalten gegenüber Ampicillin untersucht.

Tabelle 11 Ampicillinresistenz von SF

Untersuchung von *E. coli* Flexneri-Stämmen auf Ampicillinresistenz (Amp=Ampicillin), + bedeutet Wachstum (Resistenz), - bedeutet kein Wachstum (Sensibilität). Der Ampicillin-sensible Stamm 278 zeigte in einer MHK-Reihe eine Kanamycin- und Gentamicinresistenz (bis 6,4 µg/ml Gentamicin, nicht dargestellt, Methodik Seite 45).

<i>E. coli</i> Flexneri		Flüssigmedien		Festmedien	
Sero- gruppe	Stamm (Labor Adam)	TSB	TSB/Amp (100 µg/ml)	LB-Agar- Platte	LB-Agar-Platte + Amp (100 µg/ml)
1a	266	+	+	+	+
	295	+	+	+	+
1b	277	+	+	+	+
	281	+	+	+	+
2a	262	+	+	+	+
	270	+	+	+	+
	279	+	+	+	+
	288	+	+	+	+
	297	+	+	+	+
	301	+	-	+	-
3a	264	+	-	+	-
3b	303	+	-	+	-
4a	272	+	+	+	+
4a	289	+	-	+	-
6	260			+	+
	268			+	+
	271			+	+
	274			+	+
	276			+	+
	278	+	-	+	-
	282			+	+
	283			+	+
	290			+	+
	291			+	+

Als „Wirt“ für die folgenden Transformationsexperimente der *cld<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukte (2.5.1.3, S. 43) wurde mit dem Stamm 278 der einzige Ampicillin-sensible Vertreter der zur Verfügung stehenden SF-Serogruppe 6-Wildtypen gewählt. Außerdem wurden die Konstrukte in zwei pHS-2-positive SF Stämme transformiert (S264, SF Serogruppe 3a, und S289, SF Serogruppe 4a, ebenfalls Ampicillin-sensibel), um mögliche Veränderungen des LPS-Musters bei Stamm 278

mit anderen Serogruppen vergleichen zu können. Die erfolgreiche Transformation von pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>-out* und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>-out* in SF Serogruppen 6 (S278), 3a (S264) und 4a (S289) wurde gelelektrophoretisch geprüft. Dies gelang über eine Darstellung von *cld<sub>pHS-2</sub>* nach einer Plasmidpräparation, PCR und Restriktion (siehe Abbildung 3, S. 85 und Abbildung 4, S. 86).

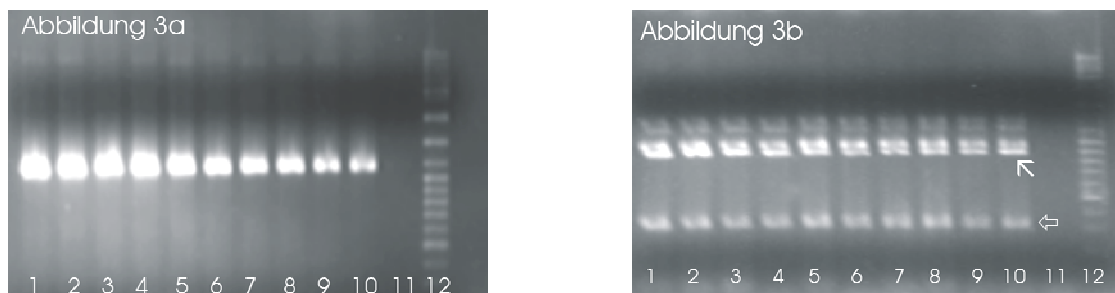
### 3.1.1.3 Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>*

Nach erfolgreicher Transformation von pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>-out* und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>-out* in die SF-Wildtypen wurde eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in diesen Stämmen überprüft. Der Nachweis einer Proteinexpression von *cld<sub>pHS-2</sub>* war eine Voraussetzung für eine Untersuchung phänotypischer Auswirkungen auf SF (z.B. Veränderung des LPS-Musters). Die beiden „out of frame“-Konstrukte besaßen – wie in Kapitel 3.1.1.1, Seite 78, beschrieben – eine antigene Erkennungssequenz, die für sechs Histidine kodierte und zusammen mit *cld<sub>pHS-2</sub>* exprimiert werden sollten.

Die zuvor isolierten und gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine der transformierten Stämme wurden in einem Western Blot auf das Vorhandensein des 6x His-tags untersucht (Methodik 2.5.2.14 bis 2.5.2.18, Seiten 62ff.). Der monoklonale Antikörper  $\alpha$ -Penta-His (mouse) (Verdünnung 1:20000 in TTSB + 3 % BSA) sollte spezifisch mit der Erkennungssequenz (6 Histidine) reagieren, die an Cld<sub>pHS-2</sub> gekoppelt war, um anschließend selbst von einem Sekundärantikörper ( $\alpha$ -mouse-POD, Verdünnung 1:20000) gebunden zu werden. Der Sekundärantikörper war über eine gekoppelte Peroxidase in der Lage, eine Lumineszenz-Reaktion in Gang zu setzen. Cld<sub>pHS-2</sub> konnte dadurch auf einem Film als Bande visualisiert werden.



Abbildung 3 pBlue-*cld*<sub>pHS-2-out</sub>, pBlue-*cld*<sub>pHS-2-in</sub> und pUC19-*cld*<sub>pHS-2-out</sub>



Gelelektrophoretische Kontrolle einer PCR der transformierten Konstrukte pBlue-*cld*<sub>pHS-2-out</sub>, pBlue-*cld*<sub>pHS-2-in</sub> und pUC19-*cld*<sub>pHS-2-out</sub> in *E. coli* Flexneri-Gruppe 6-Stämmen (278).

Abbildung 3a: PCR mit den Oligonukleotiden 1 und 2, bzw. 7 (siehe 2.4, Seite 39, Methodik 2.5.2.12, Seite 57) der drei transformierten Konstrukte (30 Zyklen, Annealing Temperatur 45°C, Fragmentlänge ca. 1150 bp). Untersucht wurden je drei Klone, von links nach rechts:

- Bahn 1: PCR von pBlue-*cld*<sub>pHS-2-out</sub> mit Oligos 1 und 2 (Klon 1)
- Bahn 2: PCR von pBlue-*cld*<sub>pHS-2-out</sub> mit Oligos 1 und 2 (Klon 2)
- Bahn 3: PCR von pBlue-*cld*<sub>pHS-2-out</sub> mit Oligos 1 und 2 (Klon 3)
- Bahn 4: PCR von pBlue-*cld*<sub>pHS-2-in</sub> mit Oligos 1 und 7 (Klon 1)
- Bahn 5: PCR von pBlue-*cld*<sub>pHS-2-in</sub> mit Oligos 1 und 7 (Klon 2)
- Bahn 6: PCR von pBlue-*cld*<sub>pHS-2-in</sub> mit Oligos 1 und 7 (Klon 3)
- Bahn 7: PCR von pUC19-*cld*<sub>pHS-2-out</sub> mit Oligos 1 und 2 (Klon 1)
- Bahn 8: PCR von pUC19-*cld*<sub>pHS-2-out</sub> mit Oligos 1 und 2 (Klon 2)
- Bahn 9: PCR von pUC19-*cld*<sub>pHS-2-out</sub> mit Oligos 1 und 2 (Klon 3)
- Bahn 10: PCR von pHS-2 (Stamm 279, *E. coli* Flexneri Gruppe 2a) mit Oligos 1 und 2, Positivkontrolle
- Bahn 11: PCR des nicht transformierten Stammes 278 (*E. coli* Flexneri Gruppe 6) mit Oligos 1 und 2, Negativkontrolle
- Bahn 12: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (2.4, Seite 39)

Abbildung 3b: PCR-Produkte aus Abbildung 3a, geschnitten mit der Restriktionsendonuklease HindIII, die *cld*<sub>pHS-2</sub> aufgrund einer Schnittstelle inmitten des Gens in zwei Fragmente teilt: 304 bp (↵) und 863 bp (↗). Methodik 2.5.2.8, Seite 53. Die obere Bande (ca. 1150 bp) entspricht dem unverdauchten Gen. Von links nach rechts:

- Bahnen 1 bis 11: wie in Abbildung 3a, jeweils 3 Stunden verdaut mit HindIII
- Bahn 12: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (2.4, Seite 39)

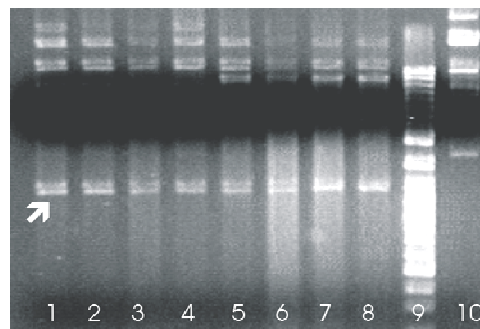
Abbildung 4 pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out und pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out in SF 3a und 4a

Gelelektrophoretische Kontrolle der Transformation der Konstrukte pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out und pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out in *E. coli* Flexneri 3a (S264) und 4a (S289). Ca. 4 µg Plasmid-DNA der jeweilig transformierten Vektoren wurden mit den Endonukleasen BamHI und PstI geschnitten. Methodik 2.5.2.8, Seite 53. Es entstand das *clp<sub>pHS-2</sub>*-enthaltende Fragment (Pfeil) von ca. 1150 bp, von links nach rechts:

- Bahn 1: pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S264, Klon 1, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 2: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S264, Klon 1, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 3: pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S289, Klon 1, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 4: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S289, Klon 1, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 5: pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S264, Klon 2, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 6: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S264, Klon 2, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 7: pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S289, Klon 2, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 8: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S289, Klon 2, geschnitten mit BamHI, PstI
- Bahn 9: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (2.4, Seite 39)
- Bahn 10: pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out aus S264, Klon 1, ungeschnitten

(Negativkontrolle)

Oberhalb der *clp<sub>pHS-2</sub>*-Bande sind Spaltprodukte des Restvektors zu sehen.



Eine Darstellung von Cld<sub>pHS-2</sub> gelang jedoch weder bei pBlue-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out noch bei pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out. Sowohl bei *E. coli* DH5α als auch bei SF Serogruppe 6 (S278), 3a (S264) und 4a (S289) misslang der Nachweis einer Expression von Cld<sub>pHS-2</sub> (Film und Western-Blot-Membran nicht dargestellt, auf Datenträger gespeichert). Auch nach einer Induktion der Proteinexpression durch IPTG (Verdünnung 1:1000, 1 mM, siehe Seite 76) gelang keine Darstellung von 6x His-getagtem Cld<sub>pHS-2</sub>. Ein systematischer experimenteller Fehler als Ursache der fehlenden Expression war unwahrscheinlich, was durch eine Positivkontrolle verifiziert wurde (Abbildung 11, Seite 96).

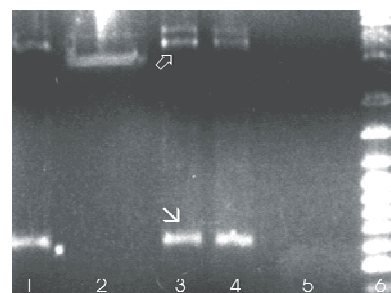
Als Positivkontrolle bei der Proteindarstellung wurde Vektor pQE16 (3999 bp, Firma Qiagen, siehe 2.3, Seite 36) gewählt, auf dem sich ein *Dehydrofolat-Reduktase*-Gen (*dhfr*) befand. DHFR (Molekulargewicht 21 kD) wurde zusammen mit sechs Histidinen exprimiert, die sich am 3'-Ende des Gens befanden und spezifisch mit Penta-His-Antikörpern reagierten. Der Nachweis von pQE16 aus *E. coli* TG1 (siehe 2.1, S. 35) erfolgte über eine gelelektrophoretische Darstellung spezifischer Fragmente nach einer Plasmidpräparation und Restriktion (siehe Abbildung 5, Seite 87, Methodik Seite 53).

Bei den Überlegungen, welche Ursache der fehlenden Expression von *cl<sub>d</sub><sub>pHS-2</sub>* zu Grunde liegen könnte, wurden auch zu niedrige Antikörperkonzentrationen in Erwägung gezogen. In weiteren Experimenten wurden sowohl die Primärantikörper- als auch die Sekundärantikörperkonzentrationen variiert, ohne dass es zu einer spezifischen Darstellung von Cld<sub>pHS-2</sub> kam (Abbildungen nicht dargestellt, auf Datenträgern gespeichert). Als weitere mögliche Fehlerquelle für die misslungene Proteinexpression galt eine Inkompatibilität der RNA-Polymerase mit dem vektoreigenen Promotor (siehe 4.2.3.1, S. 119). *P<sub>lac</sub>* und *P<sub>T3</sub>* befanden sich in pUC19 und pBluescriptKS+ vor der MCS, waren mit IPTG induzierbar und dienten sonst als Promotor für *lacZ*. Aus diesem Grunde versuchten wir, das 6x His-getagte Cld<sub>pHS-2</sub> unter der Kontrolle anderer Promotoren (*tac<sub>GST</sub>* bzw. *P<sub>T7</sub>* aus pGEX6P2 bzw. pBR322) zu exprimieren (siehe 3.1.2, Seite 87).

Abbildung 5 Vektor pQE16 in *E. coli* TG1

Gelelektrophoretische Kontrolle des transformierten Vektors pQE16 in *E. coli* TG1, geschnitten mit HindIII und BamHI, die den Vektor (3999bp) in zwei Fragmente teilen: 3399bp (↗) und 600bp (↘), von links nach rechts:

- Bahn 1: pQE16 aus *E. coli* TG1, geschnitten mit BamHI und HindIII, Klon 1
- Bahn 2: pQE16 aus *E. coli* TG1, ungeschnitten, Klon 2 (Negativkontrolle)
- Bahn 3: pQE16 aus *E. coli* TG1, geschnitten mit BamHI und HindIII, Klon 2
- Bahn 4: pQE16 aus *E. coli* TG1, geschnitten mit BamHI und HindIII, Klon 3
- Bahn 5: *E. coli* TG1
- Bahn 6: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (siehe 2.4, S. 39)



### 3.1.2 pGEX-*cl<sub>d</sub><sub>pHS-2</sub>*-out und pBR322-*cl<sub>d</sub><sub>pHS-2</sub>*-out

Für die Erstellung zwei weiterer „out of frame“-Konstrukte wurden die Expressionsvektoren pGEX6P2 und pBR322 gewählt, da beide Vektoren über einen ähnlichen Aufbau wie pUC19 und pBluescriptKS+ verfügten und mit *tac<sub>GST</sub>* bzw. *P<sub>T7</sub>* alternative Promotoren zu *P<sub>T3</sub>* und *P<sub>lac</sub>* (aus pBlue-*cl<sub>d</sub><sub>pHS-2</sub>*-out und pUC19-*cl<sub>d</sub><sub>pHS-2</sub>*-out) besaßen. Wie bei pBluescriptKS+ und pUC19 sollte eine Proteinexpression bei pGEX6P2 durch IPTG induzierbar sein. Die Erstellung der „out of frame“-Konstrukte pGEX-*cl<sub>d</sub><sub>pHS-2</sub>*-out und pBR322-*cl<sub>d</sub><sub>pHS-2</sub>*-out erfolgte nach dem gleichen

Schema wie bei pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out (3.1.1.1, Seite 78). Das bereits sequenzierte *cld<sub>pHS-2</sub>* wurde enzymatisch aus pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out herausgetrennt, um als Insert in die geöffneten Vektoren pGEX6P2 und pBR322 über eine Ligation eingesetzt zu werden. Unterschieden haben sich bei beiden Vektoren die Endonukleasen, mit denen *cld<sub>pHS-2</sub>* aus der MCS von pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out geschnitten wurde und die jeweiligen Vektoren geöffnet wurden. Bei der Erstellung von pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out wurde pGEX6P2 (aus *E. coli* BL21, Stammsammlung Labor Adam Nr. 458, siehe 2.1, Seite 35) innerhalb der MCS mit EcoRI und NotI geöffnet und dephosphoryliert. Bei pBR322 (aus *E. coli* SK1592, Labor Adam Nr. 457, Seite 35) wurden die gleichen Schritte mit den Restriktionsenzymen NheI und BamHI (siehe Grafik 10, Grafik 11, Seite 89) durchgeführt.

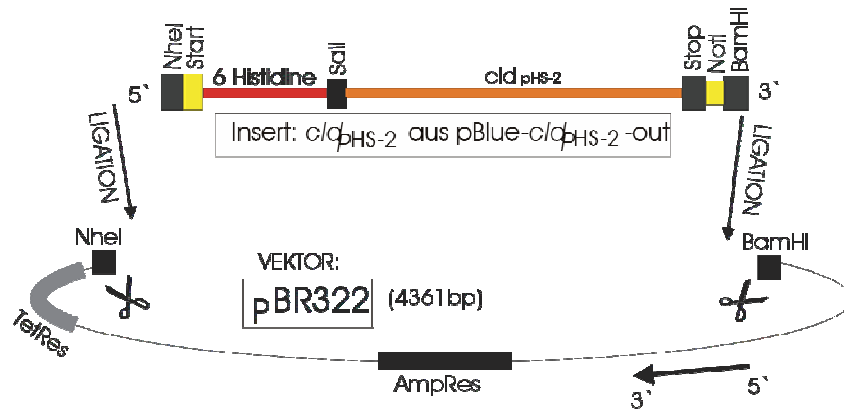
Die Ligationsprodukte pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out und pBR322-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out wurden nach der Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  und SF Serogruppen 3a, 4a und 6 (Stämme 278, 264 und 289) auf ihre Existenz überprüft, indem spezifische Fragmente nach einer Restriktion gelelektrophoretisch dargestellt werden konnten (Ergebnisse teilweise dargestellt in Abbildung 6, Abbildung 14, Seiten 90 und 101, übrige Resultate auf Datenträger gespeichert).

Ähnlich wie bei den Konstrukten pBlue-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out (siehe 3.1.1.3, Seite 84) konnte auch mit Hilfe der Konstrukte pBR322-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out und pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out (mit und ohne Induktion durch IPTG) sowohl in *E. coli* DH5 $\alpha$  als auch in SF keine Expression von Cld<sub>pHS-2</sub> nachgewiesen werden (Film und Membran nicht dargestellt, auf Datenträger gespeichert). Da es nicht gelang, mit vier verschiedenen, vektoreigenen Promotoren ( $P_{lac}$  bei pUC19,  $P_{T3}$  bei pBluescriptKS+,  $P_{T7}$  bei pBR322 und  $tac_{GST}$  bei pGEX6P2) eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* herbeizuführen, nahmen wir eine fehlende Kompatibilität von *cld<sub>pHS-2</sub>* mit den vektoreigenen Promotoren an.

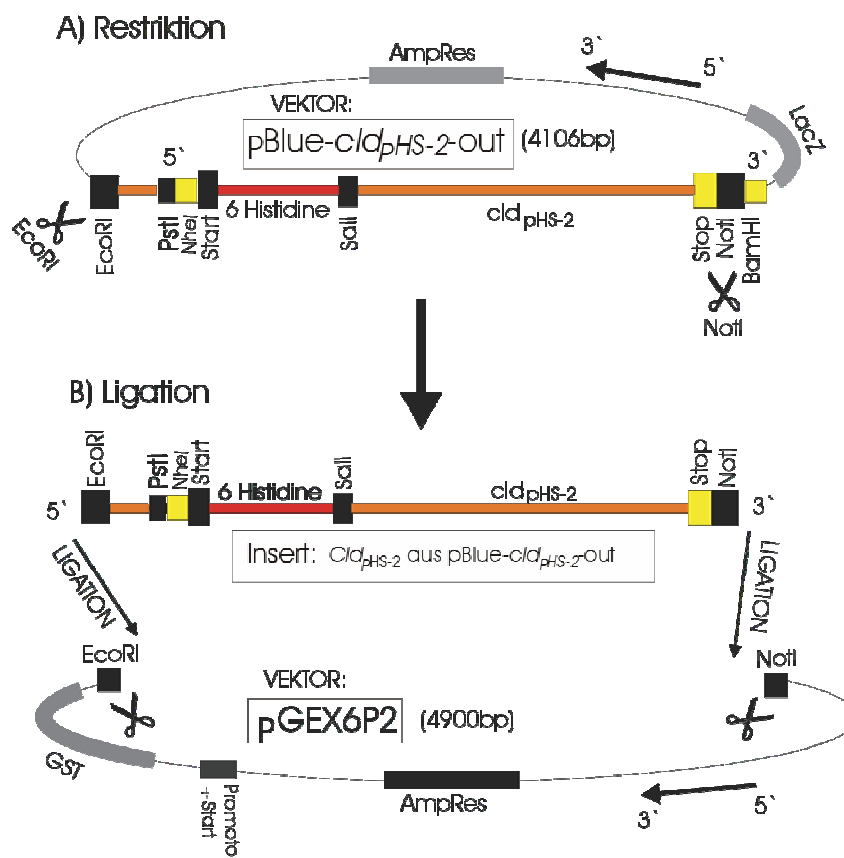
Bei der Suche nach einem kompatiblen Promotor entschlossen wir uns, den natürlichen *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor aus pHS-2 in pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out einzubauen, um eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>*

zu erzielen. Ein solcher Promotor wurde innerhalb weniger Basenpaare vor dem *cld<sub>pHS-2</sub>*-Startcodon in pHS-2 vermutet.

Grafik 10                      Konstrukt pBR322-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out



Grafik 11                      Konstrukt pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out



# Abbildung 6 pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out, pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in und pBR322-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out

Gelelektrophoretische Kontrolle der PCR von transformierten Plasmiden pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out, pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in und pBR322-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out in *E. coli* Flexneri-Gr. 6-Stämmen (278).

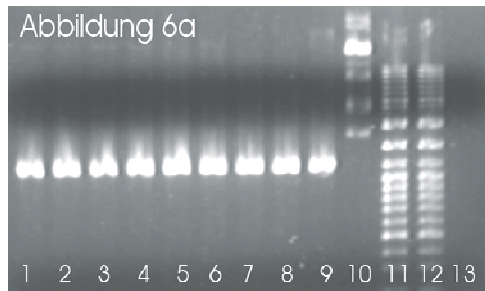


Abbildung 6a:

PCR mit den Oligonukleotiden (Oligos) 1 und 2, bzw. 7 (siehe 2.4, Seite 39) der drei transformierten Konstrukte in 30 Zyklen mit der Annealing-Temp. 45°C, Fragmentlänge ca. 1150 bp (↗), von links nach rechts:

- Bahn 1: PCR von pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in mit Oligos 1 und 7 (Klon 1)
- Bahn 2: PCR von pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in mit Oligos 1 und 7 (Klon 2)
- Bahn 3: PCR von pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in mit Oligos 1 und 7 (Klon 3)
- Bahn 4: PCR von pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out mit Oligos 1 und 2 (Klon 1)
- Bahn 5: PCR von pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out mit Oligos 1 und 2 (Klon 2)
- Bahn 6: PCR von pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out mit Oligos 1 und 2 (Klon 3)
- Bahn 7: PCR von pBR322-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out mit Oligos 1 und 2 (Klon 1)
- Bahn 8: PCR von pBR322-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out mit Oligos 1 und 2 (Klon 2)
- Bahn 9: PCR von pHS-2 (*E. coli* Flexneri Gr.2a, S279) mit Olig. 1 und 2, Positivkontrolle
- Bahn 10: pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in (Klon 1, Negativkontrolle)
- Bahnen 11 und 12: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (Seite 39)
- Bahn 13: PCR von *E. coli* Flexneri Gr.6 (S278) mit Oligos 1 und 2, Negativkontrolle

Abbildung 6b:

PCR-Produkte aus Abbildung 6a, geschnitten mit der Restriktionsendonuklease HindIII, die das *cl<sub>pHS-2</sub>*-Gen in zwei Fragmente teilt: 304 bp (↘) und 863 bp (↗), von links nach rechts:

- Bahnen 1 bis 9: wie in Abbildung 6a, 3 Stunden verdaut mit HindIII
- Bahn 10: PCR von pBlue-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out (Klon 1) mit Oligos 1 und 2, 3 Stunden verdaut mit HindIII, Positivkontrolle
- Bahn 11: PCR von pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in (Klon 1) mit Oligos 1 und 7, ungeschnitten
- Bahn 12: pGEX-*cl<sub>pHS-2</sub>*-in (Klon 1), ungeschnitten, Negativkontrolle
- Bahn 13: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (siehe 2.4, Seite 39)
- Bahn 14: PCR von *E. coli* FlexneriGr.6 (S278) mit Oligos 1 und 2, 3 Stunden verdaut mit HindIII, Negativkontrolle

### 3.1.3 pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263

#### 3.1.3.1 Erstellung der Konstrukte und Transformation in *E. coli Flexneri*

Nur wenige Basen vor dem *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gen befand sich im pHS-2-Plasmid eine kurze Sequenz, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit (TATAAT-Box) mit mehreren bekannten Promotoren der natürliche Promotor zu sein schien (Datenbank: embl:SFRAMC, M25995, siehe Seite 75). In der Erwartung, dass der putative Promotor in pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out zu einer Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* führt, wurde der Promotor vor das Startcodon von *cld<sub>pHS-2</sub>* in pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out (siehe 3.1.1.1, Seite 78) kloniert. Es wurden die zwei neuen Konstrukte pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 erstellt, bei denen zwei Sequenzen (27 bzw. 263 Basenpaare) direkt vor das Startcodon von *cld<sub>pHS-2</sub>* in die MCS des Konstruktes pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out eingefügt wurden. Die Sequenzen entsprachen jenen Basenpaaren, die sich in pHS-2 unmittelbar vor *cld<sub>pHS-2</sub>* befanden. Die putative TATAAT-Box befand sich innerhalb der ersten 27 Basenpaare, so dass beide Konstrukte im Besitz dieser Sequenz waren. Konstrukt pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 wurde zusätzlich erstellt, um weitere regulatorische Sequenzen zu erfassen, die sich in einem größeren Abstand zum Gen befinden könnten.

Für die Konstruktion von pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 (siehe Grafik 12, S. 95) mussten zwei Oligonukleotide 3 und 4 (siehe 2.4, Seite 39) erstellt werden, an deren Ende sich jeweils die zwei geöffneten Schnittstellen BamHI und PstI befanden. Die beiden Oligonukleotide enthielten ein Startcodon, eine Erkennungssequenz (6 Histidine) und 27 Basenpaare aus pHS-2 mit dem mutmaßlichen natürlichen Promotor. Das Startcodon und die antigene Erkennungssequenz befanden sich auf den Oligonukleotiden, da beides bei der Öffnung von pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out durch BamHI und PstI verloren ging. Beide Oligonukleotide waren komplementär zueinander und konnten zu einem Doppelstrang hybridisiert werden (siehe 2.5.2.7, S. 52). Die Enden des Hybridisierungsproduktes wurden phosphoryliert, ehe es in den geöffneten und

dephosphorylierten Vektor pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out über eine Ligation eingesetzt werden konnte (siehe Seiten 54ff.).

Das Ligationsprodukt pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 wurde anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* Flexneri (SF) transformiert. Anschließend konnte nach einer Plasmidpräparation die korrekte Sequenz des Inserts durch eine Sequenzierung überprüft werden (siehe Hinweistext 2, Seite 93, Methodik S. 58). Der Nachweis einer gelungenen Transformation in SF Serogruppen 3a, 4a und 6 (Stämme 264, 289 und 278) erfolgte über eine PCR und Gelelektrophorese (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8, Seite 92).

Abbildung 7 Konstrukt pUC-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 in SF Serogruppe 6

Elektrophoretische Kontrolle der PCR (Seite 57, 25 Zyklen bei einer Annealing Temp. von 45°C) des transformierten Plasmids pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 in *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 mit den Oligonukleotiden 2 und 4 (siehe 2.4, S. 39), von links nach rechts:  
 Bahn 1: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (siehe 2.4, S. 39)  
 Bahn 2: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27, Klon 1  
 Bahn 3: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27, Klon 2  
 Das PCR-Produkt besteht aus ca. 1200 bp (siehe Pfeil).  
 Positiv- und Negativkontrollen sind nicht abgebildet.

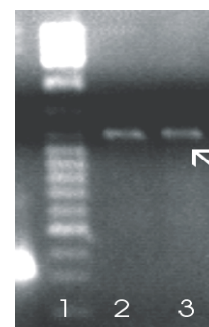
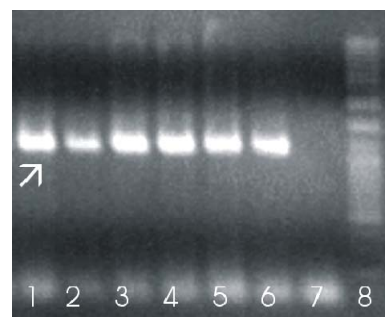


Abbildung 8 Konstrukt pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 in SF Serogruppen 3a und 4a

Gelelektrophoretische Kontrolle einer PCR (S. 57) des transformierten Plasmids pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27 aus *E. coli* Flexneri Serogruppen 3a und 4a mit den Oligonukleotiden 2 und 4 (siehe 2.4, S. 39). PCR-Reaktionsbedingungen: 25 Zyklen, Annealing Temperatur 45°C. Das PCR-Produkt besteht aus ca. 1200 bp (siehe Pfeil). Von links nach rechts:  
 Bahn 1: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 3a (Stamm 264), Klon 1  
 Bahn 2: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 3a (Stamm 264), Klon 2  
 Bahn 3: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289), Klon 1  
 Bahn 4: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289), Klon 2  
 Bahn 5: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*+27 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289), Klon 3  
 Bahn 6: pUC19- *cld<sub>pHS-2</sub>*-out aus *E. coli* DH5 $\alpha$  (Positivkontrolle)  
 Bahn 7: *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289) (Negativkontrolle)  
 Bahn 8: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (siehe 2.4, S. 39)





Hinweistext 2	Sequenzierreaktion von pUC19- <i>cl<sub>pHS-2</sub></i> +27
Aufgrund der geringen Anzahl an Nukleinsäuren (67 Basenpaare), deren Abfolge überprüft werden sollte, wurde die Sequenzierreaktion nur in eine Richtung mit dem reverse Primer Uni-rev (siehe 2.4, S. 39) durchgeführt. Das Sequenzierungsergebnis des Konstruktes pUC19- <i>cl<sub>pHS-2</sub></i> +27 dreier transformierter Klone (siehe oben) ist nicht dargestellt (im Analysis-Programm, siehe S. 75, und auf elektronischen Datenträgern gespeichert). Die Ergebnisse zweier Klone entsprachen der korrekten Sequenz des Oligonukleotids 4 (siehe S. 39), kloniert in die PstI- und Sall-Schnittstellen des Konstruktes pUC19- <i>cl<sub>pHS-2</sub></i> -out. Ein dritter untersuchter Klon entsprach einem Religationsklon und wurde verworfen.	

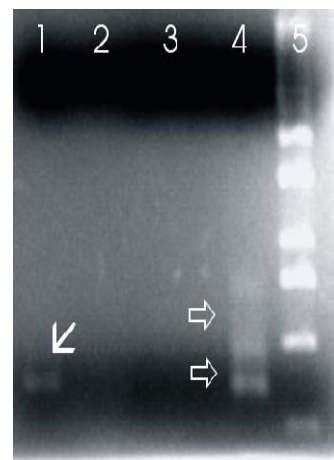
Für die Erstellung des Konstruktes pUC19-*cl<sub>pHS-2</sub>*+263 mussten zunächst jene 263 Basenpaare über eine PCR (siehe S. 57) amplifiziert werden, die sich direkt vor dem Startcodon von *cl<sub>pHS-2</sub>* in pHS-2 befanden. Dafür wurden zwei Oligonukleotid-Primer Nr. 5 und 6 (siehe 2.4, Seite 39) entwickelt, die unmittelbar vor und hinter den 263 Basenpaaren an pHS-2 (aus SF Serogruppe 2a, S279, Stammsammlung Labor Adam, Seite 35) gebunden haben. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch überprüft (Abbildung 9, Seite 93, Methode Seite 50).

Abbildung 9 PCR von pHS-2 mit den Oligonukleotiden 5 und 6

Elektrophoretische Kontrolle der PCR-Produkte des pHS-2-Plasmids (Stamm 279) mit den Oligonukleotiden 5 und 6 (Seite 39). Um eine hohe Spezifität zu erreichen, wurden Annealing-Temperaturen von 47°C, 60°C bzw. 72°C bei 25 Zyklen gewählt. Das gesamte PCR-Produkt bestand aus 331 Basenpaaren (inklusive der Schnittstellen PstI und Sall, 6 Histidinen und dem Startcodon – siehe Grafik 12, Seite 95). Von links nach rechts:

- Spur 1: PCR-Produkt von Stamm 279 mit den Oligonukleotiden 5 + 6 (Annealing-Temperatur 60°C)
- Spur 2: PCR-Produkt von Stamm 278 mit den Oligonukleotiden 5 + 6 (SF Serogruppe 6, Negativkontrolle)
- Spur 3: PCR-Produkt von Stamm 279 mit den Oligonukleotiden 5 + 6 (Annealing-Temperatur 72°C)
- Spur 4: PCR-Produkt von Stamm 279 mit den Oligonukleotiden 5 + 6 (Annealing-Temperatur 47°C)
- Spur 5: Gene Ruler Ladder Mix, DNA-Marker (siehe Seite 39)

Mit dem PCR-Produkt (331 bp, ↙) der Annealing-Temperatur von 60°C wurde weitergearbeitet. 72°C war eine zu hohe Temperatur, die PCR bei 47°C war unspezifisch, so dass mehrere Banden dargestellt wurden (⇒).



Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen Sall und PstI behandelt, um die Schnittstellen an den jeweiligen Enden der Oligonukleotide zu öffnen. Danach konnte das PCR-Produkt über eine Ligation in den (mit Sall und PstI) geöffneten und dephosphorylierten Vektor pUC19-*cl<sub>pHS-2</sub>*-out eingesetzt werden, so dass es sich unmittelbar vor *cl<sub>pHS-2</sub>* befand (Methodik ab S. 53ff.). Das Ligationsprodukt pUC19-*cl<sub>pHS-2</sub>*+263 (siehe Grafik 12, Seite 95)

wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die korrekte Basenfolge der integrierten Sequenz wurde mit einer Sequenzierung überprüft (siehe Hinweistext 3, Seite 94), um anschließend das Konstrukt in SF Serogruppen 2a, 4a und 6 (Stamm 301, 289 und 278) zu transformieren (siehe Abbildung 10, Seite 94, Methodik S. 43).

Hinweistext 3	Sequenzierungsreaktion von pUC19- <i>clp</i> <sub>pHS-2</sub> +263
Das Ergebnis der Sequenzierung des Konstruktes pUC19- <i>clp</i> <sub>pHS-2</sub> +263 mit den Sequenzierprimern M13 universal CS (forward, siehe 2.4, S. 39) und Uni-rev (reverse, S. 39) ist aufgrund seines Umfangs nicht dargestellt (im Analysis-Programm, siehe S. 75, und auf elektronischen Datenträgern gespeichert). Es zeigte bei zwei von vier untersuchten Klonen die korrekte Sequenz der integrierten 263 Basen, die sich in der MCS vor dem Startcodon des Gens <i>clp</i> <sub>pHS-2</sub> befanden, verglichen mit der Sequenz von pHS-2 aus der Gendatenbank embl:/M25995 (siehe 2.6, S. 75). Die anderen beiden untersuchten Klone besaßen eine fehlerhafte Sequenz und wurden verworfen.	

Abbildung 10 Konstrukt pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 in SF Serogruppen 2a, 4a und 6

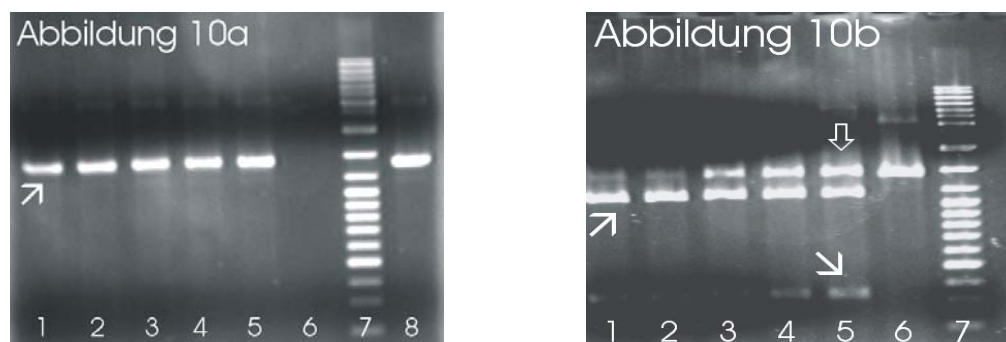


Abbildung 10a:

Elektrophoretische Kontrolle der PCR (25 Zyklen bei einer Annealing Temp. von 45°C) des transformierten Plasmids pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 in *E. coli* Flexneri Serogruppen 2a, 4a und 6 mit den Oligonukleotid-Primern Nr. 2 und 5 (Seite 39), das PCR-Produkt bestand aus ca. 1420 bp (siehe Pfeil), von links nach rechts:

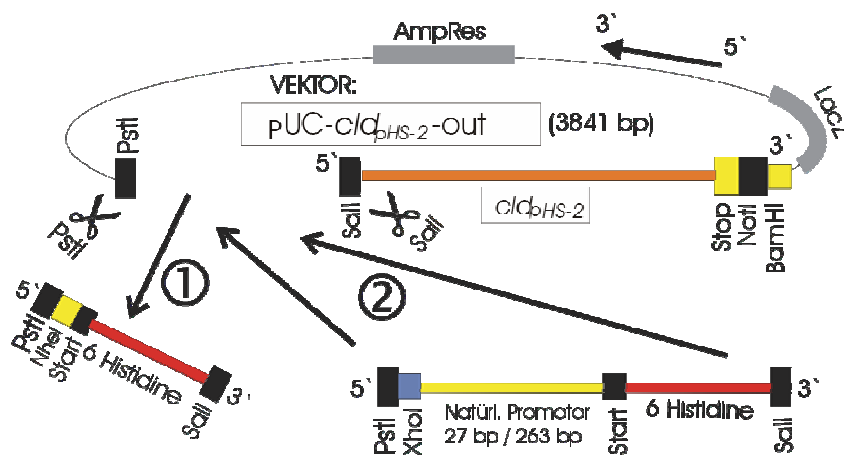
- Bahn 1: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (Stamm 278), Klon 1
- Bahn 2: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (Stamm 278), Klon 2
- Bahn 3: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289), Klon 1
- Bahn 4: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289), Klon 2
- Bahn 5: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 2a (Stamm 301), Klon 1
- Bahn 6: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (Stamm 278, Negativkontrolle)
- Bahn 7: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (Seite 39)
- Bahn 8: pHS-2 aus *E. coli* Flexneri Gr.4a (Stamm 289), Positivkontrolle

Abbildung 10b:

PCR-Produkte aus Abbildung 10a, geschnitten mit der Endonuklease SalI, die das PCR-Produkt in zwei Fragmente: *clp*<sub>pHS-2</sub> mit ca. 1150 bp (↗) und die vorgeschalteten 263 bp (↘) teilt (Ungeschnittener Vektor ↕, Methodik Seite 53). Von links nach rechts:

- Bahnen 1 bis 5: entspricht den Bahnen 1 bis 5 in Abbildung 10a, geschnitten mit SalI
- Bahn 6: pHS-2 aus S289 (SF Serogruppe 4a), geschnitten mit SalI (Negativkontrolle)
- Bahn 7: DNA-Marker, Gene Ruler Ladder Mix (Seite 39)

Grafik 12

Konstrukte pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263

pUC-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out der Grafik entspricht pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out

### 3.1.3.2 Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>*

Bei den Konstrukten pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 konnte eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* DH5α dargestellt werden (siehe Abbildung 11, Seite 96, Methodik der Isolation, Messung, Auftrennung von Proteinen ab S. 62ff.). Dies gelang mit Hilfe eines Western Blots mit α-Penta-His als Primär- (1:20000 in TTSB + 3 % BSA) und α-mouse-POD als Sekundärantikörper (1:20000 in TTSB) (siehe Seite 68). Im Gegensatz dazu konnte eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* bei pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out in *E. coli* DH5α (mit und ohne Induktion durch IPTG) nicht nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 3.1.1.3, Seite 84). Da nur pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 im Besitz des putativen natürlichen Promotors sind, erhärtete sich die Vermutung, dass eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* bei den „out-of-frame“-Konstrukten nur unter Verwendung des natürlichen *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotors gelang.

Eine Zugabe von IPTG (Verdünnung 1:1000, 1 mM) bei pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 hatte keinen Einfluss auf die Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* DH5α. Die dargestellten Proteinbanden mit und ohne IPTG zeigten keinen Unterschied in Ihrer Intensität (siehe Abbildung 11, S. 96). Dies war ein weiteres Argument für die Funktion des natürlichen Promotors, da eine Proteinexpression unter dem pHS-2-Promotor nicht durch IPTG induzierbar

ist. Außerdem bestätigten diese Daten, dass der plasmideigene Promotor in unseren Konstrukten nicht funktionell war.

Abbildung 11 Vergleich der Proteinexpression von pUC19-Konstrukten in *E. coli* DH5 $\alpha$

Abbildung 11a:

Film nach vierminütiger Belichtung durch eine Lumineszenz-Reaktion durch eine Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Reaktion wurde an den Stellen sichtbar, an denen Antikörper mit einer Peroxidase an dem Proteinkomplex (6 Histidine und Cld<sub>pHS-2</sub>, ca. 46 kDalton) gebunden haben. Vergleich der Proteinexpression von pUC19-Konstrukten („out of frame“) in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Zusatz von 3 % BSA in der Primärantikörperlösung. Verdünnung des Primärantikörpers Penta-His-Ak 1:20000, Verdünnung des Sekundärantikörpers  $\alpha$ -mouse-POD-Ak 1:20000. Von links nach rechts:

- Bahn 1: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>-out aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 2: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>-out aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  mit IPTG
- Bahn 3: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+27 aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 4: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+27 aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  mit IPTG
- Bahn 5: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 6: pUC19-*clp*<sub>pHS-2</sub>+263 aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  mit IPTG
- Bahn 7: pUC19 aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 8: pUC19 aus in *E. coli* DH5 $\alpha$  mit IPTG
- Bahn 9: Proteinstandardmarker, Fluka (Siehe 2.5.2.16, Seite 65)
- Bahn 10: *E. coli* DH5 $\alpha$  mit IPTG
- Bahn 11: pQE16 aus *E. coli* TG1 (1,5  $\mu$ g, 21 kDalton, Positivkontrolle)

Auf den Bahnen 1 bis 8 und 10 wurden je 30  $\mu$ l Proteinlösung aufgetragen, das entspricht ca.  $2 \times 10^9$  Bakterien. Die Gelelektrophorese lief 90 Minuten bei konstanten 100 V und 160 mA. Der Western Blot dauerte 60 min bei 100 V und 240 mA.

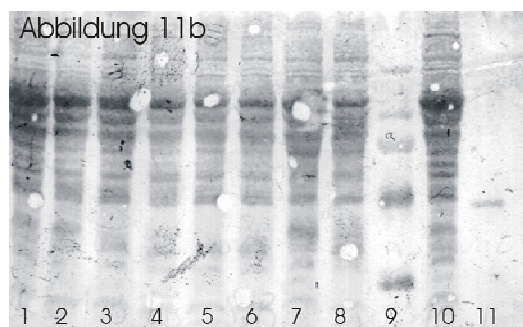
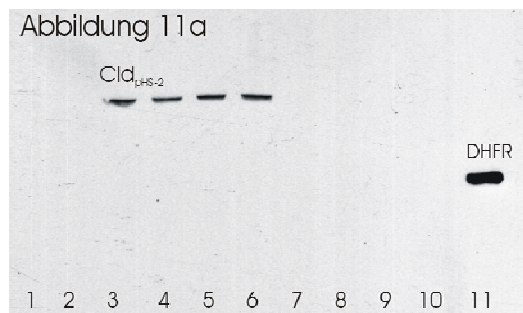


Abbildung 11b:

Nitrozellulosemembran mit Proteinbanden verschiedener pUC19-Konstrukte nach einer Anfärbung mit Amidoschwarzlösung, gleiche Bahnen wie in Abbildung 11a.

Für die Darstellung einer Expression von *clp*<sub>pHS-2</sub> in *E. coli* DH5 $\alpha$  waren besondere Modifikationen der Methodik notwendig. So misslang der Nachweis einer Expression (auch der Positivkontrolle *dhfr* aus pQE16, Abbildung 12b, Seite 98) bei Verwendung gleicher Proteinproben, wenn der Primärantikörper  $\alpha$ -Penta-His ohne den Zusatz von 3 % BSA in TTSB gelöst wurde (siehe Abbildung 12, Seite 98). Außerdem verlor der Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse-Ak in einer höheren Konzentration (Verdünnung 1:3000) seine Spezifität gegenüber dem an Cld<sub>pHS-2</sub> gebundenen Primärantikörper  $\alpha$ -Penta-His. Bei niedrigeren Verdünnungen wurden mehrere unspezifische Banden dargestellt (siehe Abbildung 12, Seite 98). Zusammenfassend

wurden optimale Reaktionsbedingungen bei einer Verdünnung von 1:20000 beider Antikörperlösungen und einem Zusatz von 3 % BSA zu der Primärantikörperlösung erreicht.

Unter gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der Darstellung von Cld<sub>pHS-2</sub> in *E. coli* DH5α (Zugabe von 3 % BSA zur Primärantikörperlösung und eine Verdünnung von 1:20000 bei beiden Antikörperlösungen) gelang es nicht, in *E. coli* Flexneri Serogruppen 2a (S301), 4a (S289) und 6 (S278) eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* unter Verwendung der „out of frame“-Konstrukte zu erzielen. Bei den Konstrukten pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 (mit natürlichem Promotor) gelang es ebenso wenig, eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF nachzuweisen, wie bei Konstrukt pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*-out, wobei die Zugabe von IPTG (1 mM, Verdünnung 1:1000) keinen Einfluss hatte (siehe Abbildung 13, Seite 99). Ein methodischer Fehler konnte bei guter Darstellbarkeit der Positivkontrolle und dem Nachweis von Cld<sub>pHS-2</sub> in *E. coli* DH5α unter Verwendung von pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27/+263 nahezu ausgeschlossen werden. Die Ursache einer fehlenden Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF (trotz der Zugehörigkeit zu *E. coli*, siehe S. 7) war am ehesten in einer fehlerhaften Produktion oder einem zu schnellen Abbau von Cld<sub>pHS-2</sub> in SF zu suchen (siehe 4.2.3.1, Seite 119).

Eine Analyse des Phänotypen von SF mit der Fragestellung, ob das Enzym Cld<sub>pHS-2</sub> in SF Serogruppe 6 eine spezifische Veränderung des LPS-Musters bewirkt, war nur möglich, wenn zuvor eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF Serogruppe 6 dargestellt werden konnte. Zusammenfassend konnte mit unterschiedlichen „out of frame“-Konstrukten keine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF nachgewiesen werden. Neben einer Störung der Produktion (Transkription und Translation) von Cld<sub>pHS-2</sub> hielten wir eine verminderte Stabilität des Proteins mit zu schnellem Abbau für eine mögliche Ursache der misslungenen Expression. In der Annahme, dass Fusionsproteine eine erhöhte Stabilität und längere Halbwertszeiten in SF besitzen könnten, versuchten wir, mit „in frame“-Konstrukten (siehe Seite 76) eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* als Fusionsprotein in SF Serogruppe 6 zu erzielen (siehe Kapitel 3.2, Seite 99).

Abbildung 12

## Optimierung von Reaktionsbedingungen bei der Proteinexpression

Abbildung 12a:

Foto nach vierminütiger Belichtung durch Lumineszenz-Reaktion der POD-gekoppelten Sekundärantikörper. Darstellung multipler Proteinbanden bei einer Verdünnung des Sekundärantikörpers  $\alpha$ -mouse-Ak von 1:3000. Primärantikörperlösung ( $\alpha$ -Penta-His, 1:20000) ohne Zusatz von BSA. Von links nach rechts:

Gleiche Reihenfolge der Bahnen wie in Abbildung 11a (Seite 96).

Abbildung 12b:

Foto nach fünfminütiger Belichtung durch Lumineszenz-Reaktion der POD-gekoppelten Sekundärantikörper. Ein Foto zweier Membranen (siehe Abbildung 12c), auf der linken Seite wurden keine Banden dargestellt, auf der rechten Seite sind mehrere Proteinbanden auf zwei Bahnen zu sehen. Von links nach rechts:

Gleiche Reihenfolge der Bahnen wie in Abbildung 12c, siehe dort.

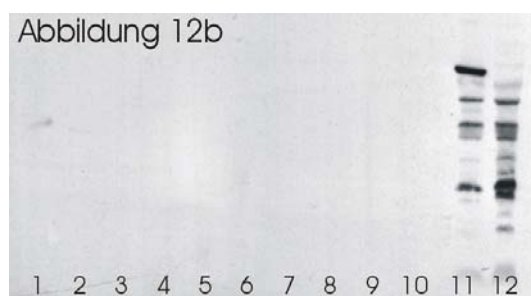
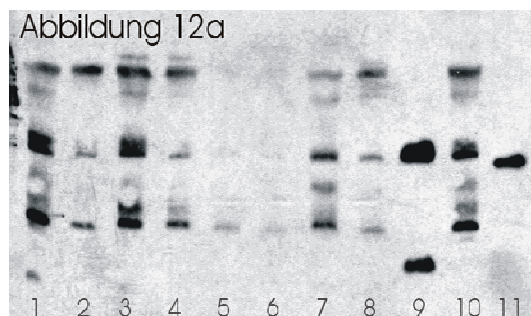


Abbildung 12c:

Nitrozellulosemembran mit Proteinbanden nach Anfärbung mit Amidoschwarz und Essigsäure 20%. Die Membran wurde nach dem Western Blot in zwei Hälften getrennt und unterschiedlich behandelt. Die linke Hälfte wurde in einer Primärantikörperlösung ( $\alpha$ -Penta-His, 1:20000) ohne BSA inkubiert, die Verdünnung des Sekundärantikörpers  $\alpha$ -mouse-Ak betrug 1:20000.

Die Primärantikörperlösung ( $\alpha$ -Penta-His, 1:20000) der rechten Hälfte enthielt 3 % BSA, die Verdünnung der Sekundärantikörpers  $\alpha$ -mouse-Ak betrug 1:3000. Von links nach rechts:

- Bahn 1: Proteinstandardmarker, Fluka, siehe 2.5.2.16, Seite 65
- Bahn 2: pQE16 in *E. coli* TG1 (1,5  $\mu$ g, 21 kDalton, Positivkontrolle, S. 87)
- Bahn 3: pUC19-*cd<sub>pHS-2</sub>*-out in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 4: pUC19-*cd<sub>pHS-2</sub>*+27 in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 5: pUC19-*cd<sub>pHS-2</sub>*+263 in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 6: *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahnen 7 bis 10 waren leer.
- Bahn 11: pUC19-*cd<sub>pHS-2</sub>*+27 in *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG
- Bahn 12: *E. coli* DH5 $\alpha$  ohne IPTG

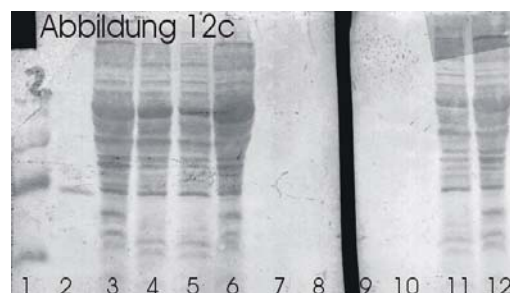




Abbildung 13

Expression von *clp<sub>pHS-2</sub>* bei pUC19-Konstrukten in *E. coli* Flexneri

Abbildung 13a:

Film nach fünfminütiger Belichtung durch eine Lumineszenz-Reaktion durch POD – gekoppelt an Antikörpern – mit  $H_2O_2$  und Luminol. Verglichen wurden Reaktionen der Primärantikörper Penta-His-Ak (Verdünnung 1:20000 in TTSB + 3% BSA) und Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse-POD-Ak (Verdünnung 1:20000) mit Proteinen aus pUC19-Konstrukten in *E. coli* Flexneri Serogruppen 4a (Stamm 289) und 6 (Stamm 278). Die Bahnen von links nach rechts entsprechen denen von Abbildung 13b, siehe dort. Reaktionsbedingungen: Gelelektrophorese dauerte 90 min bei konstanten 100 V und 170 mA. Western Blot dauerte 60 min bei konstanten 100 V und 240 mA.

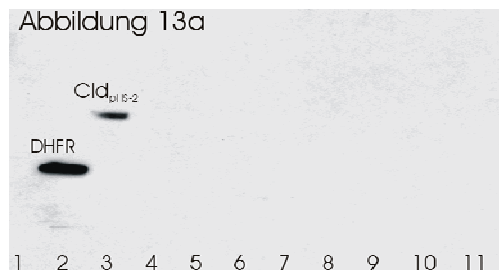
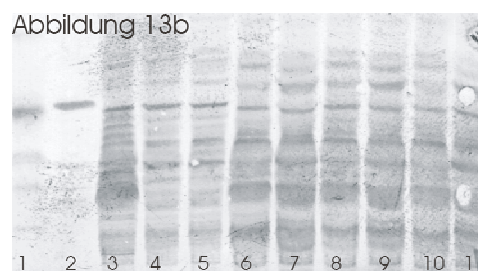


Abbildung 13b:

Nitrozellulosemembran mit Proteinbanden, angefärbt mit Amidoschwarz und Essigsäure 20% (nach Belichtung eines Filmes). Von links nach rechts:

- Bahn 1: Proteinstandardmarker, Fluka (siehe S. 65)
- Bahn 2: pQE16 in *E. coli* TG1 (Positivkontrolle, 21 kD, Seite 87)
- Bahn 3: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*+27 in *E. coli* DH5α ohne IPTG (46 kD)
- Bahn 4: *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (S289) ohne IPTG, Negativkontrolle
- Bahn 5: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (S278) ohne IPTG, Negativkontrolle
- Bahn 6: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*+263 in *E. coli* Flexneri 4a (S289) ohne IPTG
- Bahn 7: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*+263 in *E. coli* Flexneri 6 (S278) ohne IPTG
- Bahn 8: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*+27 in *E. coli* Flexneri 4a (S289) ohne IPTG
- Bahn 9: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*+27 in *E. coli* Flexneri 6 (S278) ohne IPTG
- Bahn 10: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out in *E. coli* Flexneri 4a (S289) ohne IPTG
- Bahn 11: pUC19-*clp<sub>pHS-2</sub>*-out in *E. coli* Flexneri 6 (S278) ohne IPTG



### 3.2 Arbeiten mit „in frame“-Konstrukten

Nachdem wir mit den *clp<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukten keine Expression in SF nachweisen konnten, wollten wir das *Cld<sub>pHS-2</sub>*-Protein als Fusionsprotein exprimieren. Die bislang verwendeten Expressionsvektoren (pUC19, pBluescriptKS+ und pGEX6P2) besaßen eine MCS („multiple cloning site“), in die *clp<sub>pHS-2</sub>* über zwei Schnittstellen integriert werden konnte. Unmittelbar der MCS benachbart befand sich ein Gen (z.B. *gst* in pGEX6P2), dessen Expression von einem Promotor initiiert (z.B. *tac<sub>GST</sub>* in pGEX6P2) und durch IPTG induziert wurde. Wurde *clp<sub>pHS-2</sub>* im gleichen Leseraster zu dem anderen Gen in die MCS ohne Zwischenschaltung eines Stopcodons integriert, konnte nach einer Induktion durch IPTG eine erhöhte Expression von *clp<sub>pHS-2</sub>* als Fusionsprotein erfolgen. Als Fusionsprotein wählten wir mit GST ein Protein, dessen

Expressionseigenschaften bekannt waren und das häufig zu besonders stabilen und leicht detektierbaren Fusionsproteinen führt.

### 3.2.1 pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in

Bei der Frage, welcher der erwähnten Expressionsvektoren die günstigsten Voraussetzungen für Expressionsanalysen von Fusionsproteinen besaß, entschieden wir uns für pGEX6P2. Auf dem Vektor befand sich zwischen dem Promotor *tac<sub>GST</sub>* mit Startcodon und der MCS das Gen *gst*, welches für eine Gluthation-S-Transferase (GST) kodiert hat. Das Cld<sub>pHS-2</sub>-Protein sollte mit diesem Vektor als C-terminales GST-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *tac<sub>GST</sub>*-Promotors exprimiert werden. Ein Vorteil von pGEX6P2 war, dass uns monoklonale sowie polyklonale Antikörper gegen GST zur Verfügung standen, mit denen eine spezifische Darstellung des Fusionsproteins möglich war.

#### 3.2.1.1 Erstellung des Konstrukts und Transformation in SF

Für die Konstruktion des Vektors pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in wurde *cld<sub>pHS-2</sub>* über die Schnittstellen NotI und SalI in die MCS von pGEX6P2 (präpariert aus *E. coli* BL21, Stamm 458, siehe Seite 35) integriert, so dass sich *gst* und *cld<sub>pHS-2</sub>* im gleichen Leseraster befanden. Zuvor waren jedoch mehrere Vorbereitungsschritte notwendig. Nach einer PCR von *cld<sub>pHS-2</sub>* mit den Oligonukleotidprimern Nr. 1 und 7 (siehe 2.4, Seite 39) und pHS-2 (als template-DNA aus SF Serogruppe 2a, Stamm 279, Seite 35) musste das Gen zunächst auf die korrekte Sequenz geprüft werden (Nachweis der PCR über eine Gelelektrophorese, siehe Abbildung 1, Seite 79, Methodik S. 57). Der Nachweis einer korrekten Sequenz erfolgte über eine Sequenzierung von *cld<sub>pHS-2</sub>* in pBluescriptKS+, da uns für diesen Vektor die zwei Sequenzierprimer M13 universal und uni-rev (Seite 39, Methodik S. 58) zur Verfügung standen. Nachdem *cld<sub>pHS-2</sub>* über BamHI und SalI in die

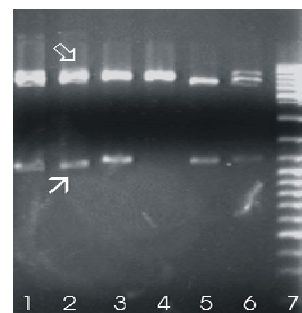


MCS von pBluescriptKS+ (aus *E. coli* JM83, Seite 35) kloniert (pBlue-*clp*<sub>HS-2</sub>-in) und die Sequenz des Gens überprüft worden war (siehe Hinweistext 4, Seite 101), konnte *clp*<sub>HS-2</sub> über die Schnittstellen NotI und SalI in die MCS von pGEX6P2 integriert werden (Methodik S. 56). Der elektrophoretische Nachweis des Konstrukts pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-in (siehe Grafik 13, Seite 101) nach einer Transformation in *E. coli* BL21 und SF Serogruppe 6 (S278) ist in Abbildung 14 (Seite 101) und in Abbildung 6 (Seite 90) dargestellt (Transformationsnachweis in SF Serogruppe 4a nicht dargestellt, auf Datenträgern gespeichert, Methodik der Transformation ab S. 41ff.).

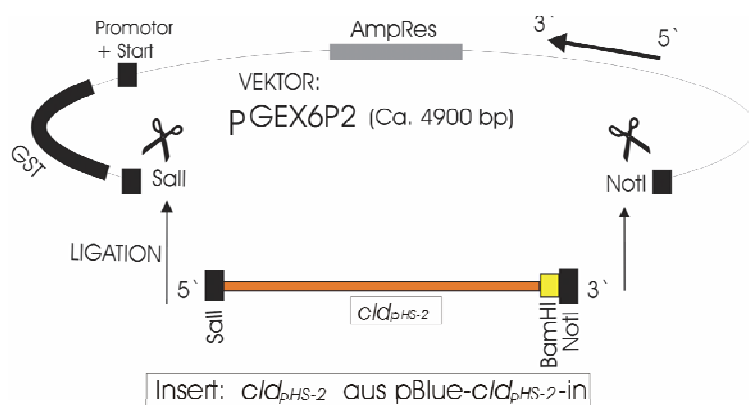
Abbildung 14 pBR322-*clp*<sub>HS-2</sub>-out, pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-in und pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-out

Gelelektrophoretische Kontrolle von pBR322-*clp*<sub>HS-2</sub>-out und pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-out aus *E. coli* DH5α bzw. pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-in aus *E. coli* BL21. Darstellung von zwei Fragmenten nach einer Restriktion: *clp*<sub>HS-2</sub> (↗) und Restvektor pGEX6P2 bzw. pBR322 (↖), von links nach rechts:

- Spur 1: pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub> in, geschnitten mit SalI und NotI, Klon 1
- Spur 2: pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub> -in, geschnitten mit SalI und NotI, Klon 2
- Spur 3: pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-out, geschnitten mit NotI und EcoRI
- Spur 4: pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-out of frame, ungeschnitten
- Spur 5: pBR322-*clp*<sub>HS-2</sub>-out, geschnitten mit BamHI und NheI, Klon 1
- Spur 6: pBR322-*clp*<sub>HS-2</sub>-out, geschnitten mit BamHI und NheI, Klon 2
- Spur 7: Gene Ruler Ladder Mix DNA-Marker (siehe Seite 39)



Grafik 13 Konstrukt pGEX-*clp*<sub>HS-2</sub>-in (6019 bp, Molekulargewicht  $3,97 \times 10^6$  g/l)



Hinweistext 4	Sequenzierreaktion von pBlue- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -in
<p>Nach einer Transformation in <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math> wurden vier Klone des Ligationsproduktes pBlue-<i>cld<sub>pHS-2</sub></i>-in (4026bp) mit einer Sequenzierreaktion auf die korrekte Sequenz von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> (integriert in die Schnittstellen BamHI und PstI der MCS von pBluescriptKS+) überprüft. Als Sequenzierprimer wurden der forward-Primer M13 universal CS und reverse-Primer Uni-rev (siehe S. 39) verwendet (Methodik Seite 58). Zwei der vier Klone entsprachen der erwarteten korrekten Sequenz von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> verglichen mit der Gendatenbank (M25995, siehe S. 75) inklusive einer in Kapitel 3.1.1.1 (Seite 78) beschriebenen Variante einer Base (Cytosin statt Thymin an Position 938 von <i>pHS-2</i>). Die anderen beiden untersuchten Klone entsprachen fehlerhaften Sequenzen. Das Sequenziererergebnis ist aufgrund seines Umfanges nicht dargestellt und auf elektronischen Datenträgern gespeichert.</p>	

### 3.2.1.2 Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>*

Der Nachweis einer Expression des Fusionsproteins GST-Cld<sub>pHS-2</sub> aus pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in erfolgte im Western Blot mit einem polyklonalen anti-GST-Primärantikörper ( $\alpha$ -GST-Z5, rabbit, Verdünnung 1:60000 in TTSB, Methodik ab S. 62ff.). Der am Fusionsprotein fixierte Antikörper  $\alpha$ -GST-Z5 wurde wiederum von einem Sekundärantikörper  $\alpha$ -rabbit-POD (siehe Seite 36, Verdünnung 1:3000 in TTSB) spezifisch gebunden, der über eine gekoppelte Peroxidase bei Zugabe von Wasserstoffperoxid eine Lumineszenz-Reaktion ausgelöst hat. Dadurch konnte das Fusionsprotein als Bande auf einem Film visualisiert werden (Seite 68). Das Fusionsprotein GST-Cld<sub>pHS-2</sub> besaß ein Molekulargewicht (MW) von 68 kD, Cld<sub>pHS-2</sub> ein MW von 42 kD und GST ein MW von 26 kD. So konnte das Fusionsprotein vom isoliert exprimierten GST anhand der spezifischen Länge der Bande durch einen Vergleich mit dem Proteinstandardmarker (Seite 65) differenziert werden.

Sowohl bei *E. coli* BL21 als auch bei *E. coli* Flexneri (SF) Serogruppen 4a und 6 (Stämme 289 und 278) gelang der Nachweis einer Expression des Fusionsproteins mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -GST-Z5 (siehe Abbildung 15, Seite 103). Die Induktion einer Proteinexpression durch IPTG (Verdünnung 1:1000) führte bei *E. coli* BL21 zu einer deutlichen Zunahme der Signalintensität der Banden. Bei SF konnte eine Expression des Fusionsproteins sogar erst nach einer Induktion durch IPTG dargestellt werden.

Mit einem monoklonalen Primärantikörper  $\alpha$ -GST-G1160 (Verdünnung 1:10000, mouse, Seite 36), der noch spezifischer, aber weniger sensitiv mit GST reagieren sollte, konnte das

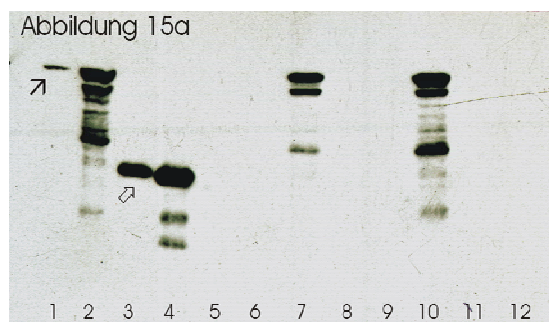
Ergebnis nicht reproduziert werden. Weder in *E. coli* BL21 noch in SF (mit oder ohne IPTG) konnte eine Expression des Fusionsproteins (bei einer Verdünnung des Sekundärantikörpers  $\alpha$ -mouse-POD von 1:20000) nachgewiesen werden. Bei einer höheren Konzentration von  $\alpha$ -mouse-POD stellten sich nur unspezifische Proteinbanden dar, wie es schon in Abbildung 12 (Seite 98) beschrieben wurde (Abbildungen nicht dargestellt, auf elektronischen Datenträgern gespeichert).

#### Abbildung 15 Fusionsprotein GST-Cld<sub>pHS-2</sub>

Abbildung 15a:

Film nach 30sekündiger Belichtung durch die Lumineszenz-Reaktion der POD mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol. Spezifische Proteinbanden von GST (↗) und des Fusionsproteins GST-Cld<sub>pHS-2</sub> (↘) aus pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in. Primärantikörper:  $\alpha$ -GST-Z5 (polyklonal, Verdünnung 1:60000 in TTSB), Sekundärantikörper:  $\alpha$ -rabbit-POD-Ak (1:3000 in TTSB), von links nach rechts:

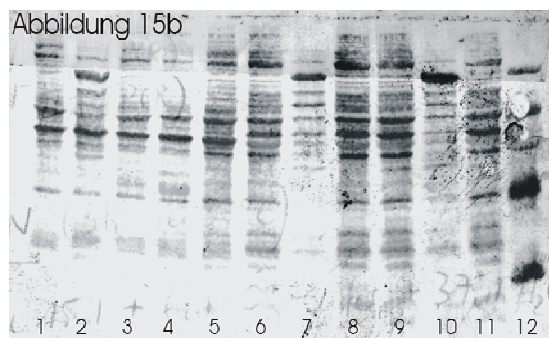
- Bahn 1: pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in aus *E. coli* BL21, ohne IPTG
- Bahn 2: pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in aus *E. coli* BL21, mit IPTG
- Bahn 3: pGEX6P2 aus *E. coli* BL21, ohne IPTG
- Bahn 4: pGEX6P2 aus *E. coli* BL21, mit IPTG
- Bahn 5: *E. coli* BL21, mit IPTG, Negativkontrolle
- Bahn 6: pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in aus SF Serogruppe 6 (S278), ohne IPTG
- Bahn 7: pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in aus SF Serogruppe 6 (S278), mit IPTG
- Bahn 8: SF Serogruppe 6 (S278), mit IPTG, Negativkontrolle
- Bahn 9: pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in aus SF Serogruppe 4a (S289), ohne IPTG
- Bahn 10: pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in aus SF Serogruppe 4a (S289), mit IPTG
- Bahn 11: SF Serogruppe 4a (S289), mit IPTG, Negativkontrolle
- Bahn 12: Protein-Standardmarker, Fluka (siehe S. 65)



Reaktionsbedingungen: Gelelektrophorese-100 min bei 100 V und 160 mA. Western Blot-60 min bei 100 V und 240 mA. Pro Bahn wurden je 30  $\mu$ l Proteine aufgetragen, was einem Proteingehalt von ca.  $1,5 \times 10^7$  Bakterien (Bahnen 6 bis 11) entspricht. Die Proteine der Bahnen 1 bis 5 wurden 1:4 mit PBS/Probenpuffer verdünnt, so dass 30  $\mu$ l Proteinlösung ca.  $4 \times 10^6$  Bakterien entsprach. Die Banden unterhalb des Fusionsproteins entsprechen enzymatischen Denaturierungsprodukten.

Abbildung 15b:








Nitrozellulosemembran mit Proteinbanden verschiedener pGEX6P2-Konstrukte nach Anfärbung mit Amidoschwarz, gleiche Bahnen wie in Abbildung 15a.



### 3.3 Übersicht der Expressionsanalysen

Um den Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* auf das LPS-Muster von SF beurteilen zu können, musste zunächst der Nachweis einer Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF Serogruppe 6 erbracht werden. Dafür wurden verschiedene Konstrukte erstellt. Bei den „out of frame“-Konstrukten, deren Ziel es war, Cld<sub>pHS-2</sub> als Einzelprotein zu produzieren, konnte keine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF nachgewiesen werden. Lediglich in *E. coli* DH5α gelang unter Verwendung von pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263, bei denen zusätzlich ein putativer natürlicher *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor integriert wurde, eine Darstellung von Cld<sub>pHS-2</sub>. Bei dem „in frame“-Konstrukt pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in konnte der Nachweis einer Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in Form eines Fusionsproteins sowohl in *E. coli* DH5α als auch in SF Serogruppen 4a und 6 erbracht werden. In SF gelang die Darstellung allerdings nur nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG (siehe Tabelle 12, Seite 104).

Tabelle 12 Übersicht über alle *cld<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukte

Konstrukt	NP	„Out of / In frame“	Ausgangsvektor	Expression von <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> in			
				BL21/ DH5α	SF 2a	SF 4	SF 6
 pBlue- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -out	-	„Out of frame“	pBluescriptKS+	-	Ø	-	-
 pUC19- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -out	-	„Out of frame“	pUC19	-	Ø	-	-
 pGEX- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -out	-	„Out of frame“	pGEX6P2	-	Ø	-	-
 pBR322- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -out	-	„Out of frame“	pBR322	-	Ø	-	-
 pUC19- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> +27	+	„Out of frame“	pUC19	+	-	-	-
 pUC19- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> +263	+	„Out of frame“	pUC19	+	-	-	-
 pGEX- <i>cld<sub>pHS-2</sub></i> -in	-	„In frame“	pGEX6P2	+	Ø	+	+

NP = Natürlicher *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor, BL21 = *E. coli* BL21, DH5α = *E. coli* DH5α, SF 2a = *E. coli* Flexneri Serogruppe 2a, bp = Basenpaare. Gelbe Kästen = Promotoren, rote Kästen = Erkennungssequenz 6 Histidine, blaue Kästen = Gene. Ø = Expressionsanalysen waren aufgrund von Transformationsschwierigkeiten der entsprechenden Vektoren in SF 2a nicht durchführbar (siehe S. 108).

### 3.4 Darstellung von Lipopolysacchariden (LPS)

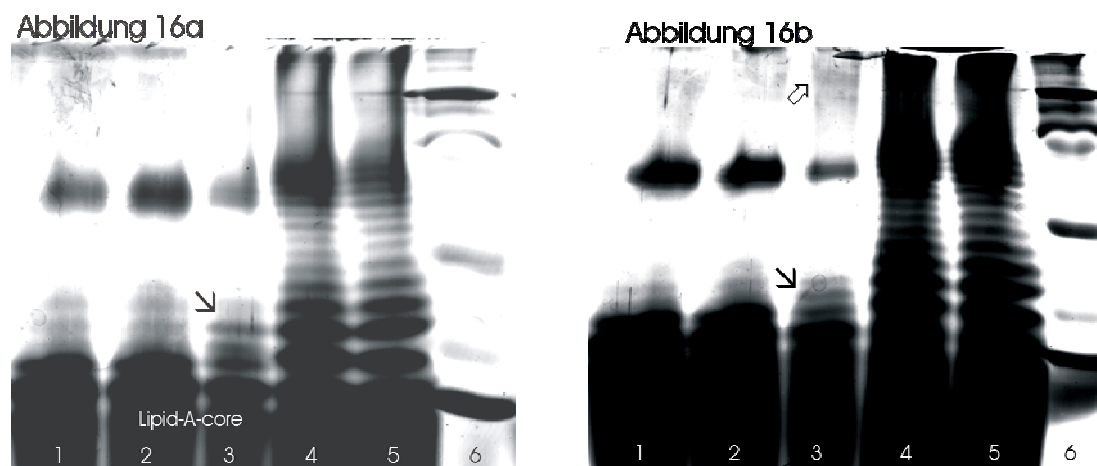
Da nur bei Konstrukt pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in der Nachweis einer Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* als Cld<sub>pHS-2</sub>-GST-Fusionsprotein in SF Serogruppe 6 gelang, sollte mit Hilfe dieses Konstruktes die Frage beantwortet werden, ob und ggf. wie *cld<sub>pHS-2</sub>* das LPS-Muster von SF Serogruppe 6 (Stamm 278) verändert. Das Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* Flexneri (SF) besteht aus Lipid A, einem Oligosaccharidkern und O-Seitenketten (siehe Seite 13). Es besitzt je nach Anzahl der repeat units eine unterschiedliche Länge. Die unterschiedlich langen LPS ergeben nach Auftrennung über eine Gelelektrophorese ein spezifisches LPS-Muster. Da für *cld<sub>pHS-2</sub>* ein Einfluss auf das LPS-Muster von SF postuliert wurde, sollte das LPS-Muster von SF Serogruppe 6 (Stamm 278) mit und ohne Einwirkung von pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in verglichen werden. Außerdem wurden die LPS-Muster von SF Serogruppe 6 mit SF Serogruppe 2a und 4a (Stämme 279 und 289, Stammsammlung Labor Adam, Seite 35), die beide im Besitz von pHS-2 waren, verglichen.

#### 3.4.1 Vergleich der LPS-Muster verschiedener SF Serogruppen

Während die LPS-Muster der SF Serogruppen 2a und 4a (Stämme 279 und 289) nahezu identisch waren, unterschied sich das LPS-Muster von Serogruppe 6 (Stamm 278) zu dem von SF 2a und 4 im mittleren Abschnitt (O-Seitenketten mit 6 - 11 repeat units, das entspricht einem Molekulargewicht von 20 kD, siehe Seite 65) und oberen Bereich des Gels (> 50 repeat units). Insgesamt präsentierten die Serogruppen 2a und 4a ein durchgehendes LPS-Muster mit kontinuierlichen Banden. Bei Serogruppe 6 waren im Gegensatz zu Serogruppe 2a und 4a keine O-Seitenketten mit 6 - 11 repeat units oder 60 -100 repeat units (Molekulargewicht größer als 60 kD) dargestellt (siehe Abbildung 16, Seite 106). Das hatte eine besondere Signifikanz, da der größte Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* auf das LPS-Muster in den Bereichen der O-Seitenketten mit 7 – 15 und mit mehr als 80 repeat units diskutiert wurde (siehe Kapitel 1.8, Seite 29). Insbesondere in diesen beiden Bereichen konnten auch in unseren Experimenten Unterschiede im LPS-Muster

der pHS-2-negativen SF Serogruppe 6 und den pHS-2-positiven SF Serogruppen 2a und 4a dargestellt werden.

Abbildung 16 LPS-Muster von SF Serogruppen 2a, 4a und 6 mit und ohne pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in



Darstellung von LPS-Mustern verschiedener *E. coli* Flexneri Serogruppen (mit und ohne pGEX-Konstrukten) mit einer Silberfärbung (Methodik der Herstellung, Elektrophorese und Anfärbung von LPS, ab Seite 70ff.). Vergleich der LPS-Muster aus *E. coli* Flexneri Serogruppe 2a (Stamm 279), Serogruppe 4a (Stamm 289) und Serogruppe 6 (Stamm 278) (mit und ohne *cld<sub>pHS-2</sub>*). Als Gemeinsamkeit der LPS-Muster konnte eine dichtere Verteilung der Banden im unteren (1 – 5 repeat units, schwarzer Pfeil) und mittleren (11 – 16 repeat units) Abschnitt dargestellt werden. Gele (Trenngel 10%) aus zwei Experimenten mit gleichen Versuchsbedingungen. Abbildung 16b (rechts) zeigt Proben nach einer Induktion der Proteinexpression durch IPTG, Abbildung 16a (links) zeigt Proben ohne IPTG-Zugabe. Pro Bahn wurden LPS von ca.  $1,4 \times 10^7$  Bakterien aufgetragen. Von links nach rechts (16a und 16b):

- Bahn 1: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (Stamm 278)
- Bahn 2: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (Stamm 278) + pGEX6P2
- Bahn 3: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (Stamm 278) + pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in
- Bahn 4: *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289)
- Bahn 5: *E. coli* Flexneri Serogruppe 2a (Stamm 279)
- Bahn 6: Proteinstandardmarker, Fluka (siehe Seite 65)

Es muss jedoch angemerkt werden, dass zwar die Anzahl an repeat units im unteren Bereich des Gels durch die Festlegung des Lipid-A-cores als unterste Bande sehr verlässlich angegeben werden konnte (siehe Beschriftung in Abb. 16a); im oberen Bereich des Gels (siehe weißer Pfeil in Abbildung 16b) dagegen war aufgrund einer geringeren Trennung die Zuordnung der jeweiligen Bande zu einer bestimmten Anzahl an repeat units nicht exakt möglich.

### 3.4.2 Auswirkung von *cld<sub>pHS-2</sub>* auf das LPS-Muster von SF Serogruppe 6

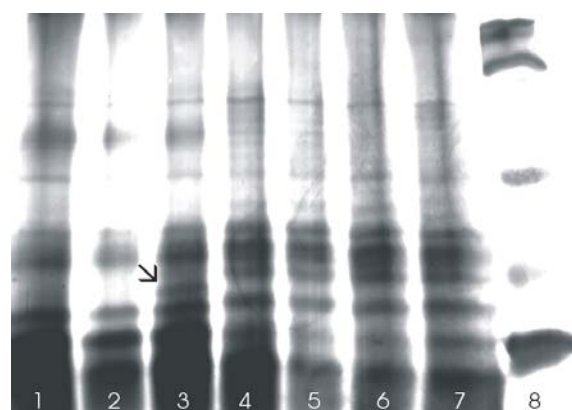
Leichte Veränderungen des LPS-Musters von SF Serogruppe 6 (Stamm 278) + pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in im Vergleich zum Wildtyp S278 konnten im unteren und oberen Bereich des Gels festgestellt

werden. Am unteren Gelrand (Bereich der O-Seitenketten mit 2 - 5 repeat units) zeigte das LPS-Muster von Stamm 278 + pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in im Vergleich zum LPS-Muster von Stamm 278 mit bzw. ohne pGEX6P2 (Negativkontrolle) ein homogeneres Muster der Banden (Abbildung 16, Seite 106). Außerdem war in diesem Bereich bei Stamm 278 mit pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in eine zusätzliche Bande dargestellt (siehe schwarzer Pfeil), die in Abbildung 17 (Seite 107) deutlicher in Erscheinung trat. In Abbildung 17 wurde mit einem höherprozentigen Separationsgel (12 %) gearbeitet, wodurch eine bessere Auftrennung der Banden im unteren Bereich erzielt wurde. Zusätzlich erschien nach einer Expressionsinduktion durch IPTG bei Stamm 278 + pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in eine weitere Bande im oberen Bereich des Gels (O-Seitenketten mit mehr als 70 – 80 repeat units, siehe weißer Pfeil in Abbildung 16b, Seite 106). Gerade in diesem Bereich wurde ein Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* vermutet, so dass insgesamt eine Modifikation des Phänotyps (in Form des LPS-Musters) von SF Serogruppe 6 durch Cld<sub>pHS-2</sub> als Fusionsprotein grundsätzlich bestätigt werden konnte, auch wenn die Veränderungen nur rudimentär ausgeprägt waren.

Abbildung 17 LPS-Muster verschiedener SF Serogruppen bei einem 12 %igen Separationsgel

Darstellung von Lipopolysacchariden (LPS) von *E. coli* Flexneri (SF) Serogruppen 2a, 4a und 6 mit und ohne pGEX-Konstrukte durch eine Silberfärbung (Seite 73). Vergleich des LPS-Musters nach Auftrennung der Banden mit einem 12 %igen Separationsgel. Es wurden LPS von ca.  $1,4 \times 10^7$  Bakterien pro Bahn aufgetragen. Von links nach rechts:

- Bahn 1: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 (Stamm 278)
- Bahn 2: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 + pGEX6P2
- Bahn 3: *E. coli* Flexneri Serogruppe 6 + pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in
- Bahn 4: *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a (Stamm 289)
- Bahn 5: *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a + pGEX6P2
- Bahn 6: *E. coli* Flexneri Serogruppe 4a + pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in
- Bahn 7: *E. coli* Flexneri Serogruppe 2a (S279)
- Bahn 8: Proteinstandardmarker, Fluka (Seite 65)



## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 Transformationsmethodik

Um bei der Transformation die Aufnahme von Plasmid-DNA zu ermöglichen, musste die Permeabilität der bakteriellen Membran durch einen Hitzeschock (z.B. zweiminütiges Erhitzen auf 42° C) oder einen elektrischen Puls (Elektroporation) erhöht werden (66). Wir haben uns in dieser Arbeit für den Hitzeschock als Energieimpuls als weniger aufwendige Methode entschieden. Für eine deutlich höhere Transformationsrate wurden kompetente Bakterien benötigt (66). Die Kompetenz der Zellen wird über eine vorherige chemische Behandlung mit Alkali- oder Erdalkalimetallkationen ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^{+}$  oder  $\text{K}^{+}$ ) in Kombination mit Chloridionen erzielt (58). Nach einer Theorie von Hanahan umgeben die Kationen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Rb}^{+}$ ) die negativ geladenen Phosphate der Plasmid-DNA und die negativ geladenen Phospholipide der Zellmembran (58). Plasmid-DNA und Phospholipide wurden von Hanahan als Polyanionen beschrieben, die sich aufgrund gleicher Ladungen abstoßen könnten (58). Mit ihrer niedrigen Ladungsdichte sind die Alkali- und Erdalkalimetallkationen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Rb}^{+}$  besonders geeignet, die schwachen negativen Ladungen der DNA und der Phospholipide auszugleichen, so dass eine Annäherung von DNA und Zelle ermöglicht wird. Anschließend verursacht ein Hitzeschock die Bildung kleiner Poren in der Zellmembran, durch die Plasmid-DNA eintreten kann. Mandel und Higa beobachteten 1970 erstmalig, dass Bakterien, die mit eisgekühlter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und einer anschließenden kurzen Erwärmung behandelt wurden, leichter mit Bakteriophagen transduziert werden konnten (98). Cohen et al. haben zwei Jahre später erfolgreich die gleiche Methode bei Bakterien angewendet, um sie mit Plasmid-DNA zu transformieren (28).



Wir verglichen kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  und SF in ihrem Transformationsverhalten, nachdem sie zuvor einer Behandlung mit Rubidiumchlorid (RbCl) oder Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) unterzogen wurden. Während wir keine Unterschiede bei RbCl- oder CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  in der Transformationsrate feststellen konnten, waren RbCl- den CaCl<sub>2</sub>-kompetenten SF deutlich überlegen (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10, S. 82). Damit konnten wir bei SF die von mehreren Autoren aufgestellte Behauptung einer Überlegenheit RbCl-kompetenter gegenüber CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien bestätigen (38, 58). Eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit RbCl-kompetenter *E. coli* gegenüber CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* kann die Einwirkung unterschiedlicher Kationen auf die Zellmembran der RbCl-kompetenten *E. coli* sein. Bei der Herstellung RbCl-kompetenter Zellen können aufgrund mehrerer Inkubationslösungen verschiedene Kationen (Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Rb<sup>+</sup>) einen Einfluss auf die negativen Ladungen von Plasmid-DNA und Phospholipiden ausüben (siehe 2.5.1.2, S. 42). Die einfach und zweifach positiv geladenen Kationen besitzen verschiedene Ionenradien (halber Abstand zwischen den Kernen zweier Ionen), die unterschiedliche Anziehungskräfte auf negative Ladungen besitzen (58). Auf diese Weise können Kationen mit unterschiedlichen Anziehungskräften die negativen Ladungen von DNA und Phospholipiden abschwächen, was bei der Transformation in SF zu einer höheren Erfolgsrate geführt haben kann. Bei der Gewinnung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* werden die Zellen nur mit CaCl<sub>2</sub> behandelt (siehe 2.5.1.1, S. 41).

Während die Transformation der pUC19- oder pBluescript-Konstrukte in kompetente *E. coli* und SF Serogruppen 4a und 6 problemlos gelang, war die Transformationsrate von Vektor pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in in kompetente *E. coli* und SF um den Faktor 10 bis 30 reduziert (Ergebnisse nicht dargestellt, auf Datenträger gespeichert), so dass nur vereinzelt erfolgreich transformierte Klone gewonnen werden konnten. Die allgemein geringeren Transformationsraten des Plasmids pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in (ca. 6000 bp) verglichen mit pUC19- oder pBluescript-Konstrukten (ca. 3700 bzw. 4000 bp) in kompetente *E. coli* und SF führten wir auf die Plasmidgröße des pGEX6P2-

Konstruktes zurück. Hanahan konnte eine reduzierte Transformationsrate in *E. coli* bei zunehmender Plasmidgröße beobachten (58), was auf eine verminderte Permeabilität der bakteriellen Membran bei größeren Vektoren schließen lässt.

Während die Transformationsreaktionen von pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in bei *E. coli* und SF Serogruppen 4a und 6 trotz der methodischen Schwierigkeiten letztlich erfolgreich waren, gelang es uns nicht, den Vektor in Stamm 301 (SF Serogruppe 2a, siehe Stammsammlung Adam, S. 35) zu transformieren (Transformationsresultate nicht dargestellt, auf Datenträger gespeichert). Bis auf die erfolgreiche Transformation der Konstrukte pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 misslangen auch die Transformationsreaktionen der out-of-frame-Konstrukte in Stamm 301 (siehe Tabelle 12, S. 104). Stamm 301 stand uns als einziger Ampicillin-sensibler Repräsentant der Serogruppe 2a zur Verfügung (siehe Tabelle 11, S. 83). Wir führten die Transformationsschwierigkeiten bei Stamm 301 am ehesten auf eine reduzierte Kompetenz der Zellen trotz chemischer Vorbehandlung (mit RbCl oder CaCl<sub>2</sub>) zurück. Da die Transformationsreaktionen aller *cld<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukte in Stamm 289 (SF Serogruppe 4a) als Repräsentant pHS-2-positiver Stämme erfolgreich waren, wurde auf eine alternative Übertragungsmethode (z.B. Elektroporation) der entsprechenden Vektoren in Stamm 301 verzichtet.

#### 4.1.2 Auswahl der Vektoren

Voraussetzung einer Analyse phänotypischer Veränderungen von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* Flexneri (SF) Serogruppe 6 war die fehlerfreie Integration des Gens in das bakterielle Genom sowie dessen Expression. Die Integration von *cld<sub>pHS-2</sub>* gelang unter Zuhilfenahme synthetischer Expressionsvektoren. Expressionsvektoren zeichnen sich durch eine Überexpression rekombinanter Proteine aus, die durch eine Reihe geeigneter Regulationsgene (z.B. Repressor) gewährleistet wird. Neben der Überexpression war die Plasmidkopienzahl für eine hohe

Expression von *clp<sub>pHS-2</sub>* entscheidend (Replikation). Da *clp<sub>pHS-2</sub>* als einzelne Kopie auf dem Plasmid vorlag, wurde durch eine hohe Kopienzahl („high-copy“-Vektoren mit einer Kopienzahl von 20 bis 700 Plasmide pro Zelle) des Plasmids nicht nur die Genexpression sondern auch die Genexpression erhöht. Optimale Expressionsbedingungen wurden unter Verwendung von „high-copy“-Expressionsvektoren (z.B. pUC19, pGEX6P2) erreicht. Von besonderer Relevanz für eine erfolgreiche Genexpression sind Promotoren, die einen ca. 100 bp langen DNA-Abschnitt mit mindestens zwei spezifischen Regionen umfassen: Eine Minus-10-Region (Pribnow-Schaller-Box), die an der Bindung der RNA-Polymerase beteiligt ist, und die Minus-35-Box. Die Stärke der Affinität der RNA-Polymerase zu der Promotorsequenz wird in relativen Promotorstärken angegeben. Die Promotorstärke wird als Rate definiert, mit der eine RNA-Polymerase einen Promotor produktiv unter Bildung einer funktionsfähigen RNA verlässt. Während der Promotor *P<sub>lac</sub>* des von uns verwendeten „high copy“-Expressionsvektors pUC19 nur die relative Promotorstärke 6 besitzt, weist *tac<sub>GST</sub>* aus pGEX6P2 die relative Promotorstärke 17 auf (30). Neben der Promotorstärke sorgt eine Regulation der Promotoren für eine hohe Expressionseffizienz. Ein Beispiel für fakultative (regulierbare) Promotoren, die sich in induzierbare und reprimierbare Promotoren einteilen lassen, sind die Promotoren *P<sub>lac</sub>* aus pUC19, *P<sub>T3</sub>* aus pBluescriptKS+ sowie *tac<sub>GST</sub>* aus pGEX6P2. Bei *P<sub>lac</sub>*, *P<sub>T3</sub>* und *tac<sub>GST</sub>* bindet ein Repressorprotein an einer Promotorregion (Operator) und erlaubt somit nur eine basale Transkription der genetischen Sequenz (sogenannte Leckrate). Lactose oder ein Äquivalent (IPTG) verbindet sich mit dem Repressorpeptid (z.B. LacI bei pUC19), das sich dann vom Operator löst, wodurch eine erhöhte Genexpression ermöglicht wird.

Die von uns ausgewählten „high copy“-Expressionsvektoren pUC19, pBluescriptKS+ und pGEX6P2 erfüllten alle relevanten Voraussetzungen für erfolgreiche Expressionsstudien. Neben einer Regulation der Genexpression durch induzierbare Promotoren besitzen die Vektoren eine multiple cloning site (MCS) mit einer breiten Auswahl an Schnittstellen, die den

Einbau von *clp<sub>pHS-2</sub>* erleichtert. Selektionsgene der drei Vektoren vermitteln den Klonen eine Antibiotikaresistenz gegenüber Ampicillin. Dadurch wird eine Selektion der Klone auf Ampicillin-haltigen Nährböden ermöglicht. Fusionsgene (*lacZ* bei pUC19 und pBluescriptKS+ sowie *gst* bei pGEX6P2) in direkter Nachbarschaft der MCS können zusammen mit *clp<sub>pHS-2</sub>* zu Fusionsproteinen exprimiert werden. Fusionsproteine besitzen neue Eigenschaften (z.B. Proteinfaltung) und können mit Hilfe geeigneter Antikörper (z.B. Anti-GST-Ak) identifiziert werden. Als wichtige Voraussetzung der Genexpression gilt die Replikationsfähigkeit der Vektoren in *E. coli* und SF. Das „*Origin of replication*“ (*ori*), eine DNA-Sequenz der Vektoren, muss vom Wirt erkannt werden, damit der Vektor sich vermehren und stabil im Wirt verbleiben kann. Verschiedenen Autoren gelang es, mit unterschiedlichen Vektoren eine Expression in SF nachzuweisen, was als Beweis für die Replikationsfähigkeit jener Vektoren in SF galt. Sansonetti et al. beschrieben in *E. coli* Flexneri eine Expression von Genen mit Hilfe von pUC18 (162). Die Vektoren pUC18 und pUC19, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, sind bis auf eine spiegelverkehrte MCS identisch. Morona et al. haben mit pBluescript in SF erfolgreiche Expressionsstudien durchgeführt (112). Eine gelungene Expression beweist außerdem eine Kompatibilität des vektoreigenen Promotors mit der bakteriellen RNA-Polymerase infolge einer gelungenen Transkriptionsinitiierung durch die Polymerase am Promotor. Erfolgreiche Expressionsanalysen mit pGEX6P2 in *E. coli* Flexneri wurden bislang noch nicht publiziert. Mit pBR322 stand uns ein vierter Expressionsvektor für eine Genexpression von *clp<sub>pHS-2</sub>* in SF zur Verfügung.

#### 4.1.3 Immundetektion von *clp<sub>pHS-2</sub>* durch Antikörper

Die erfolgreiche Expression von *clp<sub>pHS-2</sub>* wurde durch eine Immundetektion mit Antikörpern überprüft. Bei „out of frame“-Konstrukten sollten Primärantikörper spezifisch an einer

Erkennungssequenz (6 Histidine) binden. Sechs Tripletts, die für sechs Histidine kodierten, befanden sich direkt vor dem N-terminalen Beginn von *cld<sub>pHS-2</sub>* und wurden zusammen mit dem Gen exprimiert (Methodik siehe Seite 68). Bei „in frame“-Konstrukten reagierten  $\alpha$ -GST-Ak (Primärantikörper) mit GST des Fusionsproteins GST-Cld<sub>pHS-2</sub>. Anschließend wurden die an Cld<sub>pHS-2</sub> gebundenen Primärantikörper mit Hilfe einer lumeniszierenden Reaktion (Sekundärantikörper) dargestellt. Für die Immundetektion haben wir nach eigenen Modifikationen der Antikörperkonzentrationen und Pufferlösungen (siehe 3.1.3.2, S. 95) die empfohlenen Inkubationslösungen und den Versuchsaufbau der Hersteller befolgt (Antikörper wurden von *Qiagen*, *Sigma* und *Dianova* bezogen).

Bei den „out of frame“-Konstrukten entschieden wir uns für ein 6x His-tag (6 Histidine) als Erkennungssequenz. In der Arbeitsgruppe Adam (M. Abba, noch nicht veröffentlicht) konnte bereits eine Immundetektion von Cld<sub>pHS-2</sub> und dem 6x His-tag in *E. coli* DH5a erfolgreich durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil des 6x His-tag war, dass uns im Labor Adam bereits ein Detektions-Kit von *Qiagen* mit Penta-His-Antikörpern zur Verfügung stand. Wir klonierten das 6x His-tag zwischen Startcodon und N-terminalem Genanfang, um eine gemeinsame Expression der Erkennungssequenz mit dem Gen sicher zu stellen. Außerdem erschien uns die Gefahr einer Beeinflussung von Transkription und Funktion des *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gens durch das 6x His-tag bei einer N-terminalen Fusion deutlich geringer, als wenn die Gensequenz durch eine Erkennungssequenz unterbrochen worden wäre. Das Stopcodon am Genende hätte bei einer C-terminalen Lokalisation des 6x His-tag eine gemeinsame Expression verhindert.

Die gemeinsame Expression des Fusionsproteins GST-Cld<sub>pHS-2</sub> wurde durch eine Klonierung von *cld<sub>pHS-2</sub>* in die MCS von pGEX6P2 ermöglicht. Dabei befanden sich beide Gene im gleichen Leseraster. Für den Nachweis einer gelungenen Expression des Fusionsproteins standen uns mono- und polyklonale Antikörper gegen GST zur Verfügung (*Sigma*, *Santa Cruz*).

Allerdings sind bislang keine erfolgreichen Expressionsstudien mit GST-Antikörpern und einem GST-Cld<sub>pHS-2</sub>-Fusionsprotein in SF publiziert worden.

#### 4.1.4 Arbeiten mit Lipopolysacchariden

Nach einer Methode von Hitchcock et al. (61) wurden aus einer Übernachtskultur die Lipopolysaccharide der Bakterien extrahiert (Seite 70). Dabei wurden die Proteine mit Proteinase K denaturiert und von den Lipopolysacchariden (LPS) getrennt. Die Auftrennung der LPS-Banden erfolgte mit einem Polyacrylamidgel nach Laemmli (82) (Seite 72). Für die Darstellung der LPS-Banden standen mit einer Silberfärbung (183) oder einer Immundetektion zwei Methoden zur Verfügung. Während bei der Immundetektion Antikörper gezielt gegen bestimmte Bestandteile des LPS eingesetzt werden, um z.B. zwischen LPS-Banden differenzieren zu können (99, 126), werden durch Silberfärbung sämtliche Lipopolysaccharidbanden dargestellt. Für die Analyse des LPS-Musters unter dem Einfluss von Cld<sub>pHS-2</sub> war die Darstellung aller LPS-Banden wichtig, weshalb wir die Silberfärbung bevorzugten. Auf eine LPS-Immundetektion wurde in dieser Arbeit verzichtet.

Bei der Darstellung von LPS durch eine Silberfärbung nach Tsai und Frasch (183) bindet Silbernitrat an die polaren LPS, nachdem diese durch Perjodsäure oxidiert wurden (Methodik Seite 73). Es wurden zwei Modifikationen der Methode vorgenommen, da ein Ausfällen von Silbernitrat in a. bidest. nur mit Ammoniumhydroxid vermieden werden konnte. Die empfohlene Menge des Zusatzes an 30 %iger Ammoniumhydroxidlösung von 1 ml (61) musste jedoch mehr als verdoppelt werden, um das Silbernitrat in Lösung zu halten. Wir erhöhten außerdem die empfohlene Verdünnung der Entwicklerlösung, um ein langsames Anfärben der LPS-Banden zu erreichen. Die Reaktion konnte unter Beobachtung bei gewünschter Darstellung und Kontrastierung der LPS-Banden gestoppt werden.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Ampicillin-Resistenz von SF-Wildtypen

Bevor die *cld<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukte in ausgewählte SF-Stämme transformiert werden konnten, wurden mehrere SF-Wildtypen unterschiedlicher Serogruppen aus der Stammsammlung Labor Adam (siehe S. 35) auf ihre Ampicillin-Resistenz geprüft. Eine Selektion erfolgreich transformierter Klone konnte nur unter Verwendung Ampicillin-sensitiver Stämme erzielt werden, da die *cld<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukte durch ihre Selektionsgene den Bakterien eine Ampicillinresistenz vermitteln konnten.

Die große Mehrheit der von Patienten gewonnenen SF-Wildtypen besaßen natürliche Resistenzen gegen Ampicillin. Alle vier getesteten Serogruppe 1-Stämme waren ebenso resistent wie fünf der sechs untersuchten Klone aus Serogruppe 2a. Je ein Stamm der SF-Serogruppe 3a, 3b und 4a war Ampicillin-sensibel, während neun von zehn untersuchten SF-Wildtypen der Serogruppe 6 Ampicillin-Resistenzen aufwiesen (siehe Tabelle 11, S. 83). Der einzige Ampicillin-sensible SF-Wildtyp der Serogruppe 6 (Stamm 278) bildete die Grundlage der Expressionsanalysen von *cld<sub>pHS-2</sub>*.

Die bei den Patientenstämmen häufig gefundene Resistenz gegen das oft verwendete Antibiotikum Ampicillin zeigt die schnelle Anpassungsfähigkeit von SF an die Umgebung. Resistenzen enteropathogener Keime werden meist durch Mutationen oder horizontale Übertragung von Resistenzgenen (z.B. durch Konjugation) erworben. Die Resistenzentwicklung ist oft Folge eines unkontrollierten Therapieregimes von Patienten, die unter einem gastrointestinalen Infekt leiden. Der einseitige Einsatz einer Substanz oder eine Unterdosierung

mit subtherapeutischen Spiegeln kann bei den Bakterien im Rahmen eines Selektionsdrucks zu einer Resistenzentwicklung führen.

#### 4.2.2 Phylogenese der Shigella-Klone

Mit Hilfe der MLEE-Methodik („multilocus enzyme electrophoresis“) und Sequenzierung von acht „housekeeping“-Genen auf vier chromosomalen Regionen gelang es Reeves et al., aufgrund von Sequenzhomologien eine Zugehörigkeit der 46 Shigella-Klone zu *E. coli* nachzuweisen (siehe S. 7) (138, 142). Die 46 Shigella-Klone wurden von Reeves et al. drei *E. coli*-Clustern und fünf Einzelklonen zugeordnet (siehe Grafik 7, S. 34). Die Einteilung bestimmter Shigella-Klone in drei Cluster wird durch eine Analyse von Virulenzplasmiden unterstützt. Die Virulenzplasmide der Shigellen lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien in zwei Gruppen einteilen: pINV A-Plasmide und pINV B-Plasmide (141). 31 der 46 Shigella-Klone sind im Besitz eines Virulenzplasmides, welches entweder pINV A oder pINV B zugeordnet werden kann. In Cluster 1 befanden sich gehäuft Shigella-Klone mit pINV A-Plasmiden, während in Cluster 3 vermehrt Shigella-Klone mit pINV B-Plasmiden zu finden waren (141). Sequenzhomologien der acht „housekeeping“-Gene von ECOR-Stämmen zu unterschiedlichen Shigella-Klonen verschiedener Cluster lassen eine Abstammung aller Shigella-Klone von einer Shigella-Ursprungsform unwahrscheinlich erscheinen (142). Mit Hilfe molekularer Zeitberechnungen wird vermutet, dass sich die drei Cluster und fünf Einzelklone seit ca. 35 000 bis 270 000 Jahren getrennt voneinander entwickelt haben (54, 199). Dies ist im Vergleich zu der Differenzierung unterschiedlicher ECOR Gruppen vor 8 – 22 Millionen Jahren eine relativ kurze Zeitspanne (15). Unklar war, ob die chromosomale *rfb*-Region (inklusive *cld*), die für verschiedene Proteine der LPS-Produktion kodiert, und das *cld*<sub>pHS-2</sub>-Gen (pHS-2) einem einheitlichen Vererbungsmuster mit den „housekeeping“-Genen unterlegen waren. In diesem



Fall wären homologe *rfb*-Regionen sowie der gemeinsame Besitz (oder das Fehlen) eines pHS-2-Plasmids bei Shigella-Klonen innerhalb eines Clusters zu erwarten.

Bei Betrachtung der 14 SF Serogruppen fiel auf, dass bis auf SF Serogruppen 6 und 6a (Cluster 1) alle anderen zwölf Serogruppen dem Cluster 3 zugeordnet wurden (142). Neun der zwölf SF Serogruppen aus Cluster 3 waren im Besitz identischer *rfb*-Regionen (25) sowie des pHS-2-Plasmids (4). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten konnten die Stämme identische LPS-Muster aufweisen. Kongruente LPS-Muster von SF 2a und 4a konnten in dieser Arbeit dargestellt werden (siehe Abbildung 16, S. 106). Ausnahmen in Cluster 3 bildeten lediglich SF Serogruppen 5, X, Y und SB Serogruppe 12, bei denen pHS-2 nicht nachweisbar war (4). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten (pHS-2 und *rfb*-Region) der SF Serogruppen aus Cluster 3 vermuten wir, dass diese Shigella-Klone eine gemeinsame phylogenetische Entwicklung genommen haben und durch die Aufnahme des pINV B-Virulenzplasmids aus *E. coli*-Klonen entstanden sind, die bereits im Besitz von pHS-2 waren.

Ein großer Einfluss der chromosomal kodierten *rfb*-Region auf die Produktion von Oligosaccharideinheiten der O-Seitenketten war bekannt (171). Nahezu identische Oligosaccharideinheiten der SF Serogruppen X, Y und 1 bis 5 (siehe Grafik 4, S. 21) (7) waren ein weiterer Hinweis auf homologe *rfb*-Regionen der Shigella-Klone aus Cluster 3 (mit Ausnahme von SB Serogruppe 12). Die diskreten Abweichungen in der Struktur der Oligosaccharideinheiten (repeat units) von SF Serogruppen X und 1 bis 5 zu SF Serogruppe Y entsprechen Glucosylierungen oder Acetylierungen der Tetrasaccharideinheit (7, 131, 171). Untersuchungen des genetischen Materials der SF-Klone ergaben den Besitz verschiedener phagenkodierter *gtr*-Gene (Glucosyltransferase) und eines *oac*-Gens (O-Acetylierung). Die Transduktion der SF Serogruppen X, Y, 1a und 4a durch den Bakteriophagen Sf6 bewirkte eine Integration des *oac*-Gens in das bakterielle Genom und eine Acetylierung von Rhamnose (Zucker der Tetrasaccharideinheit, siehe Grafik 4, S. 21). Dadurch konvertierten diese

Serogruppen in die SF Serogruppen 3a, 3b, 1b und 4b (26, 148). Die Integration verschiedener *gtr*-Gene durch die Phagen SfI, SfII, SfV und SfX hatte eine Glucosylierung von Rhamnosezuckern oder der N-Acetyl-Glucose der Tetrasaccharideinheit zur Folge, so dass die SF Serogruppen 1a, 2a, 2b, 3a, 4a, 5a, 5b und X entstanden sind (52, 63, 64, 102, 191, 192). Die Entstehung der SF Serogruppen X und 1 bis 5 sind somit am ehesten durch eine Konversion der Tetrasaccharideinheiten von SF Serogruppe Y unter dem Einfluss phagenkodierter Gene zu erklären (7).

Da pHS-2 bei den meisten SF-Stämmen aus Cluster 3 nachgewiesen werden konnte, gehen wir von einem gemeinsamen *E. coli*-Ursprungsclon der pHS-2-positiven SF-Stämme aus. Eine gemeinsame Vererbung der *rfb*-Region und der acht „housekeeper“-Gene, die für eine Einteilung der Shigella-Klone in *E. coli*-Cluster verantwortlich waren, konnte nicht bestätigt werden. Sequenzanalysen ergaben Hinweise auf ein eigenständiges und unabhängiges Vererbungsmuster der *rfb*-Region bezogen auf andere genetische *E. coli*-Sequenzen. Während das bakterielle Genom von *E. coli* einen etwa 51 %igen Anteil an Guanin und Cytosin (G + C) besitzt, konnte in mehreren Sequenzanalysen der *rfb*-Regionen unterschiedlicher Shigella-Klone ein auffallend niedriger Gehalt an G + C (weniger als 40 %) bestimmt werden (112, 167). Reeves et al. vermuten, dass das *rfb*-Gencluster von Bakterien von außerhalb der Spezies *E. coli* stammt und über einen lateralen Transfer (z.B. durch Transduktion) in *E. coli* gelangt ist (68, 167). Sequenzanalysen von *E. coli* Sonnei (SS) unterstützen die Theorie einer Herkunft des *rfb*-Clusters von außerhalb der Spezies *E. coli*. Bei SS ist die gesamte, bei SD Serogruppe 1 sind Teile der *rfb*-Region auf einem Plasmid lokalisiert (72, 73). Aufgrund einer identischen *rfb*-Region von SS und *Plesiomonas shigelloides* (91, 135, 181) wird ein Gentransfer von *Plesiomonas* zu SS vermutet (167), während sich die ehemals vorhandene chromosomale *rfb*-Region von SS zurückgebildet haben soll (83).

Unterschiedliche *rfb*-Gensequenzen bei Shigella-Klonen des gleichen Clusters sowie identische *rfb*-Regionen bei Shigella-Klonen (z.B. SB Serogruppen 4 und 5 aus Cluster 1 bzw. 2) unterschiedlicher Cluster (45) unterstützen die Theorie, dass der Vererbungsmodus der *rfb*-Region von mehreren Faktoren beeinflusst war und nicht mit dem Vererbungsmodus der „housekeeping“-Gene übereinstimmt. Vermutlich besaßen auch Bakterien anderer Spezies Einfluss auf die Vererbung der *rfb*-Region und somit auf die Entwicklung der LPS von *E. coli*. Auch bei *cld<sub>pHS-2</sub>* wird eine Herkunft von außerhalb der Spezies *E. coli* vermutet, da *cld<sub>pHS-2</sub>* ebenfalls einen ungewöhnlich niedrigen Anteil an Guanin und Cytosin besitzt (37 %) (174).

#### 4.2.3 Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukten

##### 4.2.3.1 Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* unter Verwendung vektoreigener Promotoren

Bei den „out of frame“-Konstrukten unter Verwendung vektoreigener Promotoren konnte auch nach Induktion durch IPTG keine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* DH5 $\alpha$  oder SF nachgewiesen werden (siehe S. 84). Neben einer fehlerhaften Transkription oder Translation von *cld<sub>pHS-2</sub>* konnten methodische Fehler bei der Immundetektion des Proteins die Ursache der Expressionsproblematik sein. Ein methodischer Fehler bei der Immundetektion galt als unwahrscheinlich, da eine Positivkontrolle mit gleichen Antikörperkonzentrationen und Pufferlösungen erfolgreich dargestellt werden konnte (siehe S. 84). Die Positivkontrolle bestand aus dem Protein DHFR und der Erkennungssequenz 6x His-tag, die wie bei den „out of frame“-Konstrukten aminoterminal mit dem Zielprotein verbunden war. Eine posttranslationale, enzymatische Abspaltung des 6x His-tag von Cld<sub>pHS-2</sub> vor einer möglichen Immundetektion war bei der erfolgreichen Positivkontrolle ebenfalls unwahrscheinlich. Aufgrund einer gelungenen Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* nach einer Integration des putativen *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotors (Konstrukte pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263, siehe S. 95) sahen wir die Gründe für

die Expressionsschwierigkeiten bei den „out of frame“-Konstrukten (ohne *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor) auf transkriptionaler Ebene.

Die Ursache einer mangelhaften Transkription von *cld<sub>pHS-2</sub>* war am ehesten eine fehlerhafte Transkriptionsinitiation. Diese erfolgt durch eine Anlagerung der RNA-Polymerase an den Promotor. Die Promotorstärke (Affinität der RNA-Polymerase an die Promotorsequenz, siehe S. 110) ist abhängig vom zuständigen  $\sigma$ -Faktor (Sigmafaktor) und der Basensequenz des Promotors. Der  $\sigma$ -Faktor ist eine wichtige Untereinheit bakterieller RNA-Polymerasen. Über den  $\sigma$ -Faktor erkennt und bindet eine RNA-Polymerase einen Promotor und ist zudem Kontaktstelle für viele Aktivatorproteine. Sequenzanalysen haben ergeben, dass konservierte Bereiche des Promotors eine entscheidende Bedeutung für die Promotorerkennung durch den  $\sigma$ -Faktor haben. Dabei sind neben der Länge und Sequenzen der Konsensusregionen auch die Nähe oder Position in bezug auf den Startpunkt wichtig (89). Der  $\sigma^{70}$ -Faktor geht beispielsweise in einem Bereich von -50 bis +20 Basenpaare (bezogen auf den Startpunkt des Gens) eine Verbindung mit dem DNA-Strang ein (89). Befindet sich der Promotor in einem größeren Abstand zum Startcodon, kann die Promotorerkennung durch den  $\sigma^{70}$ -Faktor erschwert sein.

Während der *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor vom  $\sigma$ -Faktor in *E. coli* DH5 $\alpha$  erkannt wurde und eine Transkription von *cld<sub>pHS-2</sub>* bei den Konstrukten pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 erfolgt ist, gab es anscheinend Schwierigkeiten bei der Erkennung der Promotoren *P<sub>lac</sub>* (aus pUC19), *P<sub>T3</sub>* (aus pBluescriptKS+) und *tac<sub>GST</sub>* (aus pGEX6P2). Eine mögliche Ursache dieser Schwierigkeiten kann die große Distanz des vektoreigenen Promotors zum Startcodon von *cld<sub>pHS-2</sub>* gewesen sein. *P<sub>lac</sub>* und *P<sub>T3</sub>* befanden sich in einem deutlich größeren Abstand zum Gen (> 50 Basenpaare) als der *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor (ca. 14 Basenpaare). Um den Abstand zu verringern, hätte man bei den „out of frame“-Konstrukten eine Deletion der MCS-Schnittstellen zwischen vektoreigenem Promotor und *cld<sub>pHS-2</sub>* vornehmen müssen, um anschließend die Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* zu überprüfen. Durch Analyse der mRNA, die als Produkt einer Transkription bei einer

fehlerhaften Transkriptionsinitiation nicht nachweisbar sein sollte, könnte unsere Theorie überprüft werden (siehe auch 4.2.3.2, S. 121).

#### 4.2.3.2 Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* unter Verwendung des natürlichen *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotors

Unter Einsatz des natürlichen *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotors (aus Stamm 279, SF Serogruppe 2a aus Labor Adam, S. 35) gelang der Expressionsnachweis von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* DH5 $\alpha$  (siehe S. 95). In SF (Serogruppen 4a und 6) konnte jedoch keine Expression unter Verwendung des *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotors nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13, S. 99). Aufgrund einer gelungenen Expression in *E. coli* DH5 $\alpha$  sahen wir die Ursache der misslungenen Expression in SF nicht auf transkriptionaler Ebene.

Für die Transkriptionsinitiation sind in erster Linie die Promotorsequenz und der  $\sigma$ -Faktor (Sigmafaktor) der RNA-Polymerase ausschlaggebend (43, 166). Da in *E. coli* nur eine Form der RNA-Polymerase (RNA-Polymerase II) für die Transkription rekombinanter Proteine und Produktion einer mRNA aktiviert wird (166), waren die Voraussetzungen (*cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor und RNA-Polymerase II) bei den Expressionsanalysen in *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* Flexneri identisch. Die bakterielle RNA-Polymerase besteht aus einem „core enzyme“ ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ , core-complex), das unspezifisch an DNA binden kann, und aus dem Spezifitätsfaktor ( $\sigma$ -Faktor), der die Promotorspezifität ausmacht (43, 166). Die bakterielle RNA-Polymerase (core-complex) kann mit verschiedenen  $\sigma$ -Faktoren arbeiten, wobei in *E. coli* der  $\sigma^{70}$ -Faktor (hochgestellte Zahl entspricht der molekularen Masse von 70 kD) als „housekeeping“- $\sigma$ -Faktor spezifisch an Konsensusregionen von Promotoren bindet und für die Transkription der meisten Enzyme des Grundstoffwechsels verantwortlich ist. Alternative  $\sigma$ -Faktoren (z.B.  $\sigma^{32}$ - oder  $\sigma^{54}$ -Faktor) werden vor allem für spezielle Regulationen verwendet (z.B. Hitzeschock, Stickstoffmetabolismus oder Stressantwort) (43, 166). Da die LPS-Synthese Bestandteil des Grundstoffwechsels von *E. coli* ist, konnten wir bei *cld<sub>pHS-2</sub>*-Expressionsanalysen in *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* Flexneri eine Reaktion des  $\sigma^{70}$ -Faktors mit dem *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor erwarten. Der  $\sigma^{70}$ -Faktor konnte spezifisch

an den -10- und -35-Konsensussequenzen binden. Konsensussequenzen konnten beim *cld*-Promotor in *E. coli* (13) und *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor in SF (siehe 4.2.3.3, S. 124) identifiziert werden. Der *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotor ist im Gegensatz zu den induzierbaren (fakultativen) vektoreigenen Promotoren *P<sub>lac</sub>* und *tac<sub>GST</sub>* vermutlich ein konstitutiver Promotor, da er durch Modifikationen der Versuchsbedingungen (z.B. Veränderung der Temperatur, der Eisenkonzentration, des pH-Wertes oder durch Zugabe von IPTG (Abbildung 11, S. 96)) nicht induzierbar ist (126). Daher führten wir unsere Expressionsanalysen in *E. coli* DH5 $\alpha$  und SF unter konstanten Bedingungen durch (siehe Methodik, S. 62ff.). Eine weitere Beobachtung unterstützte unsere Theorie, dass die Ursache einer fehlerhaften Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF nicht auf transkriptionaler Ebene zu erwarten ist. Auch bei SF Serogruppe 4a (Stamm 289) misslang der Expressionsnachweis (siehe Abbildung 13, S. 99) des *cld<sub>pHS-2</sub>*-Konstrukts im Gegensatz zu einer gelungenen Expression des *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gens vom eigenen pHS-2-Plasmid (4).

Unter Voraussetzung einer fehlerfreien Transkription müssen weitere potentielle Fehlerquellen einer misslungenen Expression diskutiert werden. Eine instabile mRNA (messenger-RNA) als Produkt einer Transkription könnte infolge eines verstärkten Abbaus eine Ursache der fehlenden Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* gewesen sein. Entscheidend für die Stabilität der mRNA ist die Ausbildung sogenannter Haarnadelstrukturen an ihren Enden, wodurch die mRNA gegen Angriffe von RNAsen geschützt ist (43, 166). Die Ausbildung dieser Strukturen könnte N-terminal durch die Fusion mit einem 6x His-tag (Erkennungssequenz, siehe S. 112) gestört gewesen sein. Um die Stabilität der mRNA zu untersuchen, hätte man als quantitativ analytische Methode eine Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) durchführen müssen (43, 166).

Wir vermuten die Ursache einer misslungenen Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF am ehesten auf posttranslationaler Ebene. Durch die N-terminale Fusion mit dem 6x His-tag könnte die Proteinfaltung oder eine posttranslationale Modifikation (z.B. Glucosylierung) von Cld<sub>pHS-2</sub> gestört sein, wodurch eine Bindung der N- und C-terminalen hydrophoben Domänen an die

bakterielle Membran (126) verhindert wurde. Möglicherweise konnte Cld<sub>pHS-2</sub> daher nicht in den periplasmatischen Raum gelangen und war im Zytoplasma den Proteasen ausgesetzt. In *E. coli* konnten mehr als 40 Enzyme mit proteolytischer Aktivität identifiziert werden (49). Beim zytoplasmatischen Abbau instabiler und rekombinanter Proteine ist in *E. coli* besonders die Protease Lon beteiligt, deren Synthese durch eine Stressantwort der Zelle infolge einer Produktion abnormaler Proteine (z.B. Cld<sub>pHS-2</sub> nach einer fehlerhaften Proteinfaltung) um ein mehrfaches erhöht ist (49). Unter Umständen gelang in unseren Experimenten der Expressionsnachweis von Cld<sub>pHS-2</sub> in *E. coli* Flexneri nicht, da das Protein zu schnell durch Proteasen abgebaut wurde. Eine fraktionierte Analyse der membrangebundenen und zytoplasmatischen Proteine könnte Aufschluss über die Lokalisation von Cld<sub>pHS-2</sub> bei den „out of frame“-Konstrukten geben. Eine Möglichkeit die Aktivität der Proteasen zu reduzieren, sind Expressionsanalysen unter Verwendung von *E. coli*-Mutanten mit verminderter Produktion von Proteasen (43, 166). *E. coli* DH5 $\alpha$  besitzt aufgrund suprimierter Recombinasen, Restriktionsenzymen und Proteasen optimale Voraussetzungen für Expressionsanalysen (151, 152). Eine verminderte Aktivität der Proteasen wäre demzufolge der Grund für eine gelungene Expression von Cld<sub>pHS-2</sub> in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Eine Erhöhung der Halbwertszeit von Cld<sub>pHS-2</sub> in SF könnte durch eine N-terminale Fusion mit speziellen Polypeptiden erzielt werden, die als Proteinaggregat (inclusion bodies) gegen Proteasen weitgehend geschützt sind (173).

Aufgrund einer gelungenen Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF als Fusionsprotein GST-Cld<sub>pHS-2</sub> („in frame“-Konstrukt, siehe 4.2.3.4, S. 125) wurden keine weiteren Experimente durchgeführt, die eine Ursache der misslungenen Expression bei den „out of frame“-Konstrukten in SF hätten nachweisen können.

#### 4.2.3.3 Lokalisation des natürlichen $cld_{pHS-2}$ -Promotors

Da in der Literatur keine Sequenzanalysen über einen natürlichen  $cld_{pHS-2}$ -Promotor von  $cld_{pHS-2}$  beschrieben waren, der  $cld_{pHS-2}$ -Promotor bei den „out of frame“-Konstrukten jedoch für eine Expression von  $cld_{pHS-2}$  notwendig war, stellten wir anhand von Sequenzvergleichen die genaue Position des pHS-2-Promotors bzw. seiner funktionellen Sequenzen dar.

Bei einer Sequenzierung von über 100 Promotoren aus *E. coli* wurden vier homologe, sogenannte konservierte Merkmale gefunden: Ein Startpunkt des nachfolgenden Gens, eine –10-, eine –35-Konsensussequenz und der Abstand zwischen beiden (169). Das Startcodon von  $cld_{pHS-2}$  wird von einem ATG-Triplett (Basenpaare 764-766 des pHS-2-Plasmids) gebildet. Die –10-Sequenz ist ein Hexamer, dessen Mittelpunkt mit einer Schwankungsbreite von +/- 5 Basenpaare in der Regel etwa 10 Basenpaare (bp) vor dem Startcodon liegt und die Sequenz **T<sub>80</sub>A<sub>95</sub>T<sub>45</sub>A<sub>60</sub>A<sub>50</sub>T<sub>96</sub>** besitzt. Die tiefgestellten Zahlen geben die prozentuale Häufung des jeweiligen Nukleotids bei den untersuchten *E. coli* an. Die –35-Konsensussequenz, die ca. 30 bis 40 bp vor dem Gen und 15 bis 20 bp vor der –10-Konsensussequenz positioniert ist, wird mit **T<sub>82</sub>T<sub>84</sub>G<sub>78</sub>A<sub>65</sub>C<sub>54</sub>A<sub>45</sub>** beschrieben. Die –35-Konsensussequenz gilt als Erkennungssignal für die RNA-Polymerase, während die –10-Konsensussequenz als "Entwindungsdomäne" der DNA betrachtet wird (87). Auf dem pHS-2-Plasmid befindet sich 14 bis 21 Basenpaare vor dem  $cld_{pHS-2}$ -Startcodon (Positionen 743 bis 750) ein TAATATAT-Oktamer, das eine große Homologie zur –10-Konsensussequenz der untersuchten *E. coli*-Promotoren aufweist. Bei den pUC19-Mutanten gelang der Expressionsnachweis von  $cld_{pHS-2}$  in *E. coli* DH5 $\alpha$  erst, nachdem die putative –10-Konsensussequenz vor das  $cld_{pHS-2}$ -Startcodon kloniert wurde. Durch dieses Ergebnis sahen wir die TAATATAT-Sequenz als funktionalen Teilbereich (–10-Konsensussequenz) des natürlichen  $cld_{pHS-2}$ -Promotors bestätigt. Eine –35-Konsensussequenz war auf pHS-2 vor dem  $cld_{pHS-2}$ -Startcodon nicht exakt zu identifizieren. Eine maximale Homologie von 66 % konnte bei einem Hexamer, das 46 bis 41 Basenpaare vor dem Startcodon liegt (ATGATA an Positionen 718 bis



723), erkannt werden. Die putative -35-Konsensussequenz wurde zusätzlich zur -10-Konsensussequenz nur in Vektor pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 vor das *cld<sub>pHS-2</sub>*-Startcodon kloniert. Die Expressionsanalysen von *cld<sub>pHS-2</sub>* in *E. coli* DH5 $\alpha$  bei den Konstrukten pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+263 und pUC19-*cld<sub>pHS-2</sub>*+27 ergaben jedoch keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede (siehe Abbildung 11, S. 96). Wir gehen daher davon aus, dass zusätzlich zu der -10-Konsensussequenz (eventuell in Kombination mit dem vektoreigenen Promotor) keine weitere Konsensussequenz für eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* notwendig war.

#### 4.2.3.4 Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* als Fusionsprotein GST-Cld<sub>pHS-2</sub>

Bei dem „in frame“-Konstrukt pGEX-*cld<sub>pHS-2</sub>*-in konnte der Nachweis einer Expression von Cld<sub>pHS-2</sub> in Form eines Fusionsproteins GST-Cld<sub>pHS-2</sub> in SF Serogruppen 4a und 6 und *E. coli* BL21 erbracht werden (siehe Abbildung 15, S. 103). Die Klonierung eines weiteren Promotors (z.B. des natürlichen *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotors) vor das *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gen war daher nicht notwendig. Die Expressionsinduktion durch IPTG bestätigte die Funktionalität des induzierbaren *tac<sub>GST</sub>*-Promotors. Der Expression des Fusionsproteins GST-Cld<sub>pHS-2</sub> („in frame“-Konstrukt) ging eine fehlerfreie Transkription voraus. Während bei dem „in frame“-Konstrukt des Vektors pGEX6P2 die bakterielle RNA-Polymerase mit dem Promotor *tac<sub>GST</sub>* reagiert hat, misslang die Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* im „out of frame“-pGEX6P2-Konstrukt. Wir führen die misslungene Expression am ehesten auf einen zu großen Abstand des Promotors *tac<sub>GST</sub>* zum *cld<sub>pHS-2</sub>*-Startcodon zurück (siehe auch S. 119). Zwischen *tac<sub>GST</sub>* und *cld<sub>pHS-2</sub>*-Startcodon befand sich *gst* mit einer Länge von ca. 670 Basenpaaren. Da die Transkription erst am *cld<sub>pHS-2</sub>*-Startcodon beginnen sollte, wurde *cld<sub>pHS-2</sub>* in einem anderen Leseraster als *gst* in die MCS von pGEX6P2 eingebaut. Bei dem „in frame“-Konstrukt begann die Transkription am *gst*-Startcodon, das sich in unmittelbarer Nähe zur -10-Konsensusregion von *tac<sub>GST</sub>* befand (weniger als 40 Basenpaare). Im Anschluß an die Transkription von *gst* wurde *cld<sub>pHS-2</sub>* im gleichen Leseraster ohne Unterbrechung transkribiert.

Ähnlich wie bei den „out of frame“-Konstrukten unter Verwendung des *cld<sub>pHS-2</sub>*-Promotors (siehe S. 121) war beim „in frame“-Konstrukt (ohne Promotorinduktion) keine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF nachweisbar. Wir vermuten, dass es Cld<sub>pHS-2</sub> durch die N-terminale Fusion mit GST erschwert war, Verknüpfungen mit der bakteriellen Membran einzugehen (siehe auch 4.2.3.2, S. 121), wodurch das Fusionsprotein im Zytoplasma durch Proteasen vorzeitig abgebaut wurde. Erst nach einer Expressionsinduktion durch IPTG übertraf vermutlich die hohe Produktion an GST-Cld<sub>pHS-2</sub> die Abbaukapazitäten der Proteasen, so dass Cld<sub>pHS-2</sub> als Fusionsprotein in SF dargestellt werden konnte. Unterhalb der Bande von GST-Cld<sub>pHS-2</sub> waren zahlreiche Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht darstellbar, die ebenfalls spezifisch mit GST-Antikörpern reagiert haben und als Fragmente (Abbauprodukte) von GST-Cld<sub>pHS-2</sub> zu deuten waren (siehe Abbildung 15, S. 103). Diese Beobachtung unterstützte unsere Theorie, dass das Fusionsprotein verstärkt durch zytoplasmatische Proteasen abgebaut wurde.

#### 4.2.4 *cld<sub>pHS-2</sub>* modifiziert SF-Phänotypen

##### 4.2.4.1 *cld* und *cld<sub>pHS-2</sub>* modifizieren LPS-Muster bei SF

Bei dem Vergleich des LPS-Musters von Wildtypen der drei SF Serogruppen 2a, 4a und 6 (Stämme 279, 289 und 278, siehe Stammsammlung Labor Adam, S. 35) konnte als Gemeinsamkeit eine bimodale Verteilung der LPS-Banden im Gel herausgearbeitet werden. Die LPS-Muster der untersuchten Wildtypen wiesen zwei Verteilungsschwerpunkte der Banden im Gel auf, die durch O-Seitenketten mit 1 - 5 bzw. 11 - 16 Oligosaccharideinheiten (repeat units) charakterisiert waren (siehe Abbildung 16, S. 106). Aufgrund des Verteilungstyps der Banden und des LPS-Musters wird SF nach Franco et al. (42) einem S-Type (short) zugeordnet, der durch eine überwiegende Verteilung der LPS-Banden im Bereich zwischen 7 - 16 Oligosaccharideinheiten charakterisiert ist. Hong und Payne beobachteten jedoch Unterschiede im LPS-Muster pHS-2-negativer und pHS-2-positiver SF-Stämme, die wir mit unseren

Ergebnissen bestätigen konnten. pHS-2-negative SF produzierten bevorzugt O-Seitenketten mit 3 bis 12 repeat units, während bei pHS-2-positiven SF vornehmlich O-Seitenketten mit 5 bis 17 repeat units dargestellt werden konnten (siehe Abbildung 16, S. 106) (42, 126). Außerdem konnte bei den pHS-2-positiven SF Serogruppen 2a und 4a im Gegensatz zur pHS-2-negativen SF Serogruppe 6 neben LPS-Banden vom S-Typ eine zusätzliche Produktion von O-Seitenketten des VL-Typs (mit mehr als 70-80 repeat units) dargestellt werden (siehe Abbildung 16, S. 106) (42, 126).

Verschiedene Autoren konnten in Experimenten mit *cld*- und *cld<sub>pHS-2</sub>*-Mutanten beweisen, dass die beiden Gene für die spezifische Produktion unterschiedlich langer O-Seitenketten (und damit für das spezifische LPS-Muster) bei SF verantwortlich sind (126, 174). *Cld<sub>pHS-2</sub>*-mutierte Stämme der SF Serogruppe 2a waren nicht mehr in der Lage, O-Seitenketten des VL-Typs zu produzieren, das LPS-Muster war identisch zu dem von SF Serogruppe 6 und entsprach einer Verteilung vom S-Typ (111, 174). Eine Mutation des *cld*-Gens eines SF 2a-Stammes hatte jedoch zur Folge, dass nur noch O-Seitenketten vom VL-Typ produziert wurden, während O-Seitenketten des S-Typs fehlten. *Cld<sub>pHS-2</sub>-cld*-Doppelmutanten produzierten O-Seitenketten mit einer randomisierten Längenverteilung, wobei hauptsächlich kurze O-Seitenketten bis 40 repeat units gebildet wurden (111). Mit Hilfe der Mutanten konnte bewiesen werden, dass *cld* bei SF für eine Produktion von O-Seitenketten des S-Typs sorgt, während unter dem Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* O-Seitenketten des VL-Typs produziert werden.

#### 4.2.4.2 Einfluss der O-Seitenketten (LPS) auf die Virulenz von SF

Die spezifische Längenverteilung der O-Seitenketten vom S- und VL-Typ bei pHS-2-positiven SF-Stämmen bzw. vom S-Typ bei pHS-2-negativen SF-Stämmen besitzt einen großen Einfluss auf die Virulenz der Bakterien (126). Morona et al. konnten zeigen, dass die Länge der O-Seitenketten die Bindung von IcsA an der äußeren bakteriellen Membran von SF beeinflusst

(111). IcsA ist ein bakterielles Protein, welches an der äußeren Membran unipolar bindet und eine Aktinpolymerisation erzeugt (145, 179, 47). Durch die Polymerisation wird eine Beweglichkeit und interzelluläre Ausbreitung von SF erzeugt. Die interzelluläre Ausbreitung ermöglicht SF eine rasche Infektion mehrerer Zellen (Invasion) und erhöht damit ihre Virulenz. Die interzelluläre Ausbreitung verursacht experimentell eine Plaquebildung infizierter HeLa-Zellen. Morona et al. haben *cld*-Mutanten und *cld*<sub>pHS-2</sub>-*cld*-Doppelmutanten eines SF Serogruppe 2a-Stammes kreiert. Die *cld*-Mutante, die nur noch O-Seitenketten vom VL-Typ produziert hat, konnte im Gegensatz zur Doppelmutanten und zum Wildtyp (O-Seitenketten vom S- und VL-Typen) keine Aktinpolymerisation und Plaquebildung der HeLa-Zellen auslösen (111). Da bei allen Mutanten eine identische Produktion von IcsA nachweisbar war, konnte ein direkter Einfluss der O-Seitenkettenlänge auf die IcsA-Produktion ausgeschlossen werden (111, 126). Eine mögliche Erklärung für die verminderte Invasivität der *cld*-Mutanten von SF Serogruppe 2a war, dass sehr lange O-Seitenketten mit mehr als 80 repeat units den Kontakt von IcsA mit der Bindungsstelle an der äußeren bakteriellen Membran erschwerten, was eine verminderte Aktinpolymerisation zur Folge hatte (111). SF-Stämme, die neben O-Seitenketten vom VL-Typ auch kurze O-Seitenketten (S-Typ) produzierten (SF Serogruppe 2a-Wildtyp), besaßen wie die *cld*<sub>pHS-2</sub>-Mutante (produziert O-Seitenketten vom S-Typ) zumindest streckenweise Abschnitte mit kurzen LPS auf ihrer äußeren Membran, wodurch eine IcsA-Bindung und somit die Aktinpolymerisation ermöglicht wurde. Um diese Theorie zu stützen, wäre eine quantitative Analyse von IcsA an der äußeren Membran (z.B. durch eine Antikörper-vermittelte Detektion) bei den unterschiedlichen SF-Mutanten hilfreich. Erste Ergebnisse scheinen die Theorie zu bestätigen, da die *cld*-Mutante (VL-Typ) im Vergleich zum Wildtyp eine weniger intensive Anfärbung des membrangebundenen IcsA zeigte (111).

Aufgrund der Produktion sehr langer LPS konnte eine deutliche Akzentuierung der Immunantwort des Wirts durch pHS-2-positive SF im Vergleich zu pHS-2-negativen SF trotz

des negativen Einflusses auf die Aktinpolymerisation beobachtet werden (126). Hong und Payne erkannten, dass pHS-2-positive SF-Serogruppen eine höhere Serumresistenz *in vitro* gegenüber pHS-2-negativen SF-Serogruppen aufwiesen (126). Als mögliche Ursache der erhöhten Resistenz wird die *cld<sub>pHS-2</sub>*-geförderte Produktion sehr langer O-Seitenketten (VL-Typ) diskutiert, die eine komplementvermittelte Reaktion der Serum-Antikörper an der äußeren bakteriellen Membran verhindert (47, 179). Der Nachweis einer verminderten Serumantikörper- oder Komplementbindung an der äußeren Membran pHS-2-positiver Stämme steht jedoch noch aus. Dieser Nachweis könnte zum Beispiel durch eine Immunfluoreszenzanfärbung der gebundenen Antikörper erfolgen.

Bei einem Serény-Test haben pHS-2-positive SF eine deutlich schwerere und prolongierte Keratokonjunktivitis bei Mäusen ausgelöst als *cld<sub>pHS-2</sub>*- oder *cld*-defiziente SF-Mutanten (126). Die Kombination von O-Seitenketten vom S- und VL-Typ ermöglicht den pHS-2-positiven SF eine höhere Virulenz durch die Kombination einer hohen Invasivität und Serumresistenz, die eine verstärkte Immunantwort des Wirts zur Folge hat (111).

#### 4.2.4.3 SF Serogruppe 6-Mutante modifiziert LPS-Muster

Nachdem bewiesen werden konnte, dass *cld<sub>pHS-2</sub>* das LPS-Muster bei pHS-2-positiven SF-Stämmen (z.B. Serogruppen 2a und 4a) durch eine Produktion sehr langer O-Seitenketten vom VL-Typ modifiziert, ohne einen negativen Einfluss auf die Virulenz der SF-Wildtypen auszuüben (111), sollte der Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* auf das LPS-Muster von pHS-2-negativen SF-Stämmen (Serogruppe 6) untersucht werden. *Cld<sub>pHS-2</sub>* wurde isoliert von dem Restvektor pHS-2 über einen Klonierungsvektor in SF Serogruppe 6 transferiert. Da bei den „out of frame“-Konstrukten der Nachweis einer Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* in SF Serogruppe 6 (S278) misslang (siehe 3.1.1.3, S. 84 und 3.1.3.2, S. 95), wurde der Einfluss von *Cld<sub>pHS-2</sub>* als

Fusionsprotein im Verbund mit GST auf das LPS-Muster von SF Serogruppe 6 untersucht.

Bekannt war, dass *cld* aus SF das LPS-Muster anderer Spezies modifiziert, so dass O-Seitenketten vom S-Typ produziert wurden, nachdem *cld* isoliert in das Genom anderer Bakterien integriert wurde (55, 112). Es sollte untersucht werden, ob *cld*<sub>pHS-2</sub> als Fusionsprotein das LPS-Muster eines pHS-2-negativen SF-Stammes (S278) durch eine zusätzliche Produktion von O-Seitenketten des VL-Typs modifizieren konnte. Nach einer Expressionsinduktion mit IPTG waren die Veränderungen des LPS-Musters der SF Serogruppe 6-Mutante (S278 + pGEX-*cld*<sub>pHS-2</sub>-in) zwar nur rudimentär ausgeprägt, es konnte jedoch eine zusätzliche Bande dargestellt werden, die O-Seitenketten mit ca. 70 – 100 repeat units entsprach (siehe Abbildung 16, Seite 106). Der Nachweis einer Produktion von O-Seitenketten des VL-Typs bestätigte den Einfluss von Cld<sub>pHS-2</sub> als Fusionsprotein auf das LPS-Muster eines pHS-2-negativen SF-Stammes.

Die geringen Veränderungen des LPS-Musters durch GST-Cld<sub>pHS-2</sub> führen wir auf eine reduzierte Funktion von Cld<sub>pHS-2</sub> durch die N-terminale Fusion mit GST zurück. Cld-Proteine unterschiedlicher Spezies von Enterobacteriaceae besitzen wie das Cld<sub>pHS-2</sub>-Protein eine N- und C-terminale hydrophobe Region mit homologen Sequenzen (108). Während beispielsweise Sequenzanalysen der Cld-Proteine von SF und *Salmonella enterica* typhimurium eine Identität von ca. 70 % ergaben, glichen sich die hydrophoben Regionen der beiden Cld-Proteine sogar zu 80 % (112). Eine Verankerung der N- und C-terminalen hydrophoben Region von Cld an der inneren Membran (IM) der Bakterien konnte nachgewiesen werden, die dazwischen liegende große hydrophile Domäne befand sich im periplasmatischen Raum (112). Durch die Verankerung an der IM konnte Cld zusammen mit der Polymerase Wzy (siehe Tabelle 1, S. 18) seine Wirkung auf die Produktion der O-Seitenketten im periplasmatischen Raum entfalten (108, 112). Für Cld<sub>pHS-2</sub> wird aufgrund der Sequenzhomologien zu Cld (174) und des ähnlichen Aufbaus mit einer C- und N-terminalen, hydrophoben Domäne ebenfalls ein Wirkungsbereich

im periplasmatischen Raum postuliert (108). Hong und Payne gelang nach Fraktionierung der Zellbestandteile eines SF 2a-Stammes der Nachweis von Cld<sub>pHS-2</sub> in der bakteriellen Membran (126). Die Verankerung der N-terminalen Domäne von Cld<sub>pHS-2</sub> an der IM kann bei unserem Fusionsprotein durch die N-terminale Fusion mit GST behindert sein. Außerdem können Bindungen von Cld<sub>pHS-2</sub> mit anderen Proteinen, die als Kofaktoren der LPS-Synthese fungieren, durch die Fusion mit GST beeinflusst werden. Mehrere Autoren stellten die Theorie auf, dass Cld<sub>pHS-2</sub> über die hydrophoben N- und C-terminalen Domänen mit Proteinen aus dem *rfb*-Komplex (z.B. Wzy, siehe Tabelle 1, S. 18) fusioniert, um die volle Wirkung entfalten zu können (12, 112). Ein biochemischer Nachweis dieser Proteinkomplexe steht allerdings noch aus.

Mutationen einzelner Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der N-terminalen Domäne des Cld-Proteins schwächten die Wirkung des Proteins deutlich ab. Die Mutation der Aminosäure K31 zu A31 verursachte sogar einen kompletten Wirkungsverlust von Cld (112). Aufgrund von Strukturhomologien der beiden Cld-Proteine vermuten wir, dass auch bei Cld<sub>pHS-2</sub> einzelne Aminosäuren in Umgebung der N-terminalen Domäne großen Einfluss auf die Wirkung des Proteins besitzen. Möglicherweise wird durch die N-terminale Bindung von GST an Cld<sub>pHS-2</sub> auch die Wirkung einzelner Aminosäuren des Cld<sub>pHS-2</sub>-Proteins abgeschwächt. LPS-Analysen von SF-Mutanten nach Mutation einzelner Aminosäuren würden Aufschluss über die funktionelle Relevanz N-terminaler Aminosäuren des Cld<sub>pHS-2</sub>-Proteins geben.

#### 4.2.5 Ausblick

Wir konnten eine gering ausgeprägte, aber spezifische Veränderung des Phänotyps pHS-2-negativer SF (SF Serogruppe 6-Mutante) durch *cld<sub>pHS-2</sub>* als Fusionsprotein nachweisen. Die Veränderung bestand aus einer zusätzlichen Produktion einer LPS-Bande vom VL-Typ. Vermutlich liegt die nur schwach ausgeprägte Veränderung des LPS-Musters in einer

Wirkungsabschwächung von Cld<sub>pHS-2</sub> als Fusionsprotein begründet. Die N-terminale Fusion mit GST behindert möglicherweise die Bindung des Proteins an der bakteriellen Membran. Eine funktionelle Relevanz der hydrophoben Domänen und der N-terminalen Aminosäuren konnte bei Cld nachgewiesen werden. Bei Cld<sub>pHS-2</sub> erscheinen diese Bereiche ebenfalls von großer Relevanz zu sein (126). Eine fraktionierte Analyse der membrangebundenen und zytoplasmatischen Proteine nach chemischer und physikalischer Trennung der Zellbestandteile unserer Mutante könnte Aufschluss über die Lokalisation des Fusionsproteins geben. Eine verminderte Membranbindung von GST-Cld<sub>pHS-2</sub> unserer Mutante verglichen mit Cld<sub>pHS-2</sub> von pHS-2-positiven SF könnte Hinweise auf eine Behinderung der Funktion von Cld<sub>pHS-2</sub> durch die N-terminale Proteinbindung geben. Die Ergebnisse einer fraktionierten Analyse der membrangebundenen und zytoplasmatischen Proteine könnten daher nicht nur die schwache Ausprägung der phänotypischen Modifikation unserer Mutante aufklären, sondern auch weiteren Aufschluss über die Wirkungsweise von Cld<sub>pHS-2</sub> im allgemeinen geben.

Die gering ausgeprägten, aber spezifischen Veränderungen des LPS-Musters unserer SF-Mutante werfen außerdem die Frage auf, ob die Modifikationen Einfluss auf die Virulenz der Bakterien haben. Es wurde argumentiert, dass eine erhöhte Serumresistenz der pHS-2-positiven SF durch die *cld<sub>pHS-2</sub>*-gesteuerte Produktion von VL-LPS begründet sei (siehe S. 127) (47, 179). Demnach sollte unsere SF Serogruppe 6-Mutante im Vergleich zu pHS-2-negativen SF eine erhöhte Serumresistenz bzw. Virulenz aufweisen, die *in vitro* oder im Tierversuch mit einem Serény-Test überprüft werden könnte. Im Serény-Test würde sich die erhöhte Serumresistenz der SF Serogruppe 6-Mutante ähnlich wie bei den pHS-2-positiven SF in Form einer prolongierten und akzentuierten Konjunktivitis der infizierten Mäuse äußern (126). Experimentelle Untersuchungen der Virulenz oder Serumresistenz unserer Mutante waren nicht mehr Bestandteil der Arbeit. Der Nachweis einer erhöhten Virulenz der SF Serogruppe 6-Mutante im Vergleich zu pHS-2-negativen SF würde den direkten Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* auf die Virulenz von



Shigellen bestätigen. Da Virulenz und Serumresistenz der Bakterien den klinischen Verlauf einer Infektion beeinflussen, würde das Forschungsgebiet um *cld<sub>pHS-2</sub>* auch eine klinische Bedeutung erlangen.

Neben dem vermeintlich positiven Einfluss auf die Virulenz wird von einigen Autoren auch das gehäufte Auftreten einer Reaktiven Arthritis (ReA) nach Infektionen mit pHS-2-positiven SF auf den Besitz des *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gens zurückgeführt (23, 174). Möglicherweise ist die Zunahme dieser postinfektiösen Komplikation Folge einer bakteriellen Produktion von LPS des VL-Typs und der damit zusammenhängenden erhöhten Serumresistenz der Bakterien. Das gehäufte Auftreten einer Reaktiven Arthritis nach einer Infektion mit unserer SF Serogruppe 6-Mutante im Vergleich zu pHS-2-negativen SF würde einen direkten Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* auf die ReA bestätigen. Der experimentelle Nachweis einer Zunahme an Reaktiven Arthritiden nach Infektionen mit unserer SF-Mutante erfordert jedoch die Durchführung von Tierversuchen an Primaten, die neben dem Menschen die einzigen potentiellen Wirte einer Shigellose darstellen. Diese Experimente sind aufgrund ethischer Einwände in Deutschland nicht zugelassen.

## 5 Zusammenfassung

Bei neun von vierzehn Serogruppen der Subspezies *E. coli* Flexneri (SF) konnte ein pHS-2-Plasmid nachgewiesen werden. Es besteht eine positive Korrelation zwischen pHS-2-positiven SF und dem Auftreten einer Reaktiven Arthritis, eine Komplikation der bakteriellen Ruhr. Verschiedene Autoren führen das gehäufte Auftreten der Reaktiven Arthritis bei pHS-2-positiven SF auf eine erhöhte Serumresistenz zurück, die den Bakterien durch das *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gen vermittelt wird. Das *cld<sub>pHS-2</sub>*-Gen als längstes aller 18 „open reading frames“ auf dem pHS-2-Plasmid kodiert für ein 35 kD großes Protein, das aufgrund seiner Funktion als „chain length determinant“ (Cld<sub>pHS-2</sub>) bezeichnet wurde. Cld<sub>pHS-2</sub> ist maßgeblich an der Produktion von Lipopolysacchariden vom VL-Typ beteiligt. LPS vom VL-Typ produzieren O-Seitenketten mit mehr als 70 bis 80 Oligosaccharideinheiten und sollen die bakterielle Membran vor einer Komplementbindung und Serum-Antikörpern schützen, wodurch den Bakterien eine erhöhte Serumresistenz vermittelt werde.

In dieser Arbeit wurde *cld<sub>pHS-2</sub>* in einen pHS-2-negativen Stamm der SF Serogruppe 6 integriert, um nachzuweisen, dass *cld<sub>pHS-2</sub>* das LPS-Muster pHS-2-negativer SF in charakteristischer Weise modifiziert. Während der Expressionsnachweis von *cld<sub>pHS-2</sub>* als Einzelprotein misslang, war eine Expression von *cld<sub>pHS-2</sub>* als Fusionsprotein in SF Serogruppe 6 erfolgreich. Im Vergleich zu pHS-2-negativen SF war unsere SF Serogruppe 6-Mutante nun in der Lage, LPS vom VL-Typ in Form einer zusätzlichen Bande zu produzieren. Diese phänotypische Veränderung war zwar nur gering ausgeprägt, konnte jedoch den spezifischen Einfluss von *cld<sub>pHS-2</sub>* als Fusionsprotein auf das LPS-Muster pHS-2-negativer SF nachweisen.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Achtman M, Heuzenroeder M, Kusecek B, Ochman H, Caugant D. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infection and Immunity* 1986;51:268-276.
2. Adam T. A role for the small GTPase rho in epithelial cell invasion by *Shigella*. *Bull.-Inst.-Pasteur* 1998;96:93-102.
3. Adam T, Arpin M, Sansonetti PJ, Prevost MC, Gounon P. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J.Cell Biol.* 1995;129:367-381.
4. Adam T, Siewerdt R, Offermann I, Lang J, Tschäpe H, Sieper J, Graf B. Prevalence and molecular diversity of pHS-2-plasmids, marker for arthritogenicity, among clinical *Shigella* isolates. *Microbes Infect.* 2003;5 (7):579-592
5. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406 (6797):782-787.
6. Allaoui A, Mournier J, Prevost MC, Sansonetti PJ, Parsot C. icsB: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol.Microbiology* 1992;6:1605-1616.
7. Allison GE, Verma NK. Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends in Microbiology* 2000;8 (1):17-23.
8. Amor PA, Whitfield C. Molecular and functional analysis of genes required for expression of group IB K antigens in *Escherichia coli*: characterization of the his-region containing gene clusters for multiple cell-surface polysaccharides. *Mol.Microbiology* 1997;26 (1):145-161.
9. Barr K, Klena J, Rick PD. The modality of enterobacterial common antigen polysaccharide chain lengths is regulated by o349 of the *wec* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriology* 1999;181 (20):6564-6568.
10. Barzu S, Sansonetti PJ, Parsot C, Benjelloun Touimi Z, Phalipon A. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. *Infection and Immunity* 1997;65:1599-1605.
11. Bastin DA, Brown PK, Haase A, Stevenson G, Reeves PR. Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerisation resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol.Microbiology* 1993;7:725-734.
12. Bastin DA, Romana LK, Reeves PR. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the *rfb* gene cluster determining the O antigen of an *E. coli* O111 strain. *Mol.Microbiology* 1991;5:2223-2231.
13. Batchelor RA, Alifano P, Biffali E, Hull RA, Hull SI. Nucleotide sequence of the genes regulating O-polysaccharide antigen chain length (*rol*) from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: protein homology and functional complementation. *J.Bacteriology* 1992;174:5228-5236.
14. Batchelor RA, Haraguchi RA, Hull SI, Hull RA. Regulation by a novel protein of the bimodal distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J.Bacteriology* 1991;173:5704
15. Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol.-Biol.-Evol.* 1998;15 (1):6-16.
16. Bernardini ML, Mournier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-aktin. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 1989;86:3867-3871.

17. Blaser MJ, Pollard RA, Feldman RA. Shigella infections in the United States, 1974-1980. *J.Infect.Dis.* 1983;147:771-775.
18. Braga V, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA. The small GTPases rho and rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J.Cell Biol.* 1997;137:1421-1431.
19. Branigan PJ, Gerard HC, Hudson AP, Schumacher HRJr, Prando J. Comparison of synovial tissue and synovial fluid as the source of nucleic acids for detection of Chlamydia trachomatis by polymerase chain reaction. *Arthritis & Rheumatism* 1996;39:1740-1746.
20. Braun J, Tuszewski M, Ehlers S. Nested polymerase chain reaction strategy simultaneously targeting DNA sequences of multiple bacterial species in inflammatory joint diseases. II. Examination of sacroiliac and knee joint biopsies of patients with spondyloarthropathies and other arthritides. *J.Rheumatology* 1997;24:1101-1105.
21. Bronner D, Clarke BR, Whitfield C. Identification of an ATP-binding cassette transport system required for translocation of lipopolysaccharide O-antigen side-chains across the cytoplasmic membrane of Klebsiella pneumoniae serotype O1. *Mol.Microbiology* 1994;14:505-519.
22. Burmester GR, Daser A, Kamradt T. Immunology of reactive arthritides. *Annu.Rev.Immunol.* 1995;13:229-250.
23. Calin A, Fries J. An "experimental" epidemic of Reiter's syndrome revisited. *Ann.Intern.Med.* 1976;84:564-566.
24. Chart H, Said B, Stokes N, Rowe B. Heterogeneity in expression of lipopolysaccharides by strains of Escherichia coli O157. *J.Infect.* 1993;27:237-241.
25. Cheah K-C, Beger DW, Manning PA. Molecular cloning and genetic analysis of the rfb region from Shigella flexneri type 6 in Escherichia coli K-12. *FEMS Microbiology Letters* 1991;67 (2):213-218.
26. Clark CA. The oac gene encoding a lipopolysaccharide O-antigen acetylase maps adjacent to the integrase-encoding gene on the genome of Shigella flexneri bacteriophage Sf6. *Gene* 1991;107:43-52.
27. Clerc P, Sansonetti PJ. Entry of Shigella flexneri into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving aktin polymerization and myosin accumulation. *Infection and Immunity* 1987;55:2681-2688.
28. Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 1972;69:2110
29. Daniels C, Vindurampulle C, Morona R. Overexpression and topology of the Shigella flexneri O-antigen polymerase (Rfc/Wzy). *Mol.Microbiology* 1998;28:1211-1222.
30. Deuschle U, Kammerer W, Gentz R, Bujard H. Promoters of Escherichia coli: A hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. *EMBO J.* 1986;5:2987-2994.
31. Dmitriev BA, Backinowsky LV, L'vov VL, Knirel YA, Kochetkov NK. The structure of the chemical repeating-unit of the O-specific polysaccharide chain of Shigella boydii 6 lipopolysaccharide. *Carbohydr.Res.* 1975;41:329-333.
32. Dmitriev BA, Knirel YA, Kochetkov NK, Jann B, Jann K. Cell-wall lipopolysaccharide of the "Shigella-like" Escherichia coli O58. Structure of the polysaccharide chain. *Eur.J.Biochem.* 1977;79 (1):111-115.
33. Dmitriev BA, Knirel YA, Sheremet OK, Shashkov AS, Kochetkov NK, Hofman IL. Somatic antigens of Shigella. The structure of the specific polysaccharide of Shigella newcastle (Sh. flexneri type 6) lipopolysaccharide. *Eur.J.Biochem.* 1979;98:309-316.
34. Dmitriev BA, L'vov VL, Kochetkov NK, Hofman IL. Antigenic polysaccharides of bacteria. VI. The

structure of the O-specific polysaccharide chain of *Shigella dysenteriae* type 4 lipopolysaccharide. Bioorg.-Khim.(Russian) 1977;3:1226-1233.

35. Dodgson C, Amor PA, Whitfield C. Distribution of the *rol* gene encoding the regulator of lipopolysaccharide O-chain length in *Escherichia coli* and its influence on the expression of group I capsular K antigens. J.Bacteriology 1996;178:1895-1902.
36. DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. J.Infect.Dis. 1989;159:1126-1128.
37. Edwards PR, Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 3. Ed. Minneapolis: Burgess Publishing, 1972
38. Ellard J et al. RbCl transformation procedure for improved efficiency. The NEB Transcript. A scientific newsletter from New England Biolabs. 1994; April: 7.
39. Erbing C, Svensson S, Hammarstrom S. Structural studies on the O-specific side chains of the cell wall lipopolysaccharide from *E. coli* O75. Carbohydr.Res. 1975;44:259-265.
40. Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of the Enterobacteriaceae. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1986:
41. Finch M, Rodey G, Lawrence D, Blake P. Epidemic Reiter's syndrome following an outbreak of shigellosis. Eur.J.Epidemiol. 1986;2:26-30.
42. Franco AV, Liu D, Reeves PR. The Wzz (Cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain length specificity. J.Bacteriology 1998;180:2670-2675.
43. Friehs KH. Massnahmen zur Verbesserung der Produktion von rekombinanten Proteinen und Plasmid-DNS. Habilitationsschrift, Technische Fakultät AG Fermentationstechnik. 1999.
44. Gangarosa EJ, Perera DR, Mata LJ, Mendizabal-Morris C, Guzman G, Reller LB. Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. II. Epidemiologic studies in 1969. J.Infect.Dis. 1970;122:181-190.
45. Gerard HC, Branigan PJ, Schumacher HRJr, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression. J.Clin.Pathol. 1998;51:803-806.
46. Ghosh TK, Rao CVN, Chakraborty AN, Dastidar SG. Structural studies on a polysaccharide from *Shigella dysenteriae* type 7. Carbohydr.Res. 1982;102:241-251.
47. Goldberg M. Aktin-based motility of intracellular microbial pathogens. Microbiol Mol Biol Rev. 2001;65:595-626.
48. Goldman RC, Leive L. Heterogeneity of antigenic-side-chain length in lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111 and *Salmonella typhimurium* LT2. Eur.J.Biochem. 1980;107:145-153.
49. Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. Ann. Rev. Genet. 1996;30:465-506.
50. Granfors K, Jalkanen S, Toivanen P, Koski J, Lindberg AA. Bacterial lipopolysaccharide in synovial fluid cells in *Shigella* triggered reactive arthritis. J.Rheumatology 1992;19:500
51. Groß RJ, Rowe B, Cheasty T, Thomas LV. Increase in drug resistance among *Shigella dysenteriae*, *Sh flexneri*, and *Sh boydii*. Brit.-Med.-J.-(Clin.-Res.-Ed.) 1981;283:575-576.
52. Guan G. Functional analysis of the O antigen glucosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX. Microbiology 1999;145:1263-1273.
53. Guth B, Pacheco A, von Kruger W, Ferreira L. Comparison of outer membrane protein and

lipopolysaccharide profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Sao Paulo, Brazil. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 1995;28:545-552.

54. Guttman DS, Dykhuizen DE. Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science* 1994;266 (5189):1380-1383.
55. Guzmán CA, Klee SR, Tzschaschel BD, Timmis KN. Influence of Different *rol* Gene Products on the Chain Length of *Shigella dysenteriae* Type 1 Lipopolysaccharide O Antigen Expressed by *Shigella flexneri* Carrier Strains. *J.Bacteriology* 1997;179 (7):2421-2425.
56. Hale TL. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol.Rev.* 1991;55:206-224.
57. Hammer M, Nettelbreker E, Hopf S. Chlamydial rRNA in the joints of patients with Chlamydia-induced arthritis and undifferentiated arthritis. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1992;10:63-66.
58. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983;166(4):557-580.
59. Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol.Microbiology* 1998;30:221-232.
60. High N, Mournier J, Sansonetti PJ, Prevost MC. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO Journal* 1992;11:1991-1999.
61. Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological Heterogeneity Among *Salmonella* Lipopolysaccharide Chemotypes in Silver-Stained Polyacrylamid Gels. *J.Bacteriology* 1983;154 (1):269-277.
62. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4) - deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* 1999;162:3749-3752.
63. Huan PT. Molecular characterization of the genes involved in O-antigen modification, attachment, integration and excision in *Shigella flexneri* bacteriophage SfV. *Gene* 1997a;195:217-227.
64. Huan PT. *Shigella flexneri* type-specific antigen V: cloning, sequencing and characterization of the glucosyl transferase gene of temperate bacteriophage SfV. *Gene* 1997b;195:207-216.
65. Hughes RA, Hyder E, Treharne JD, Keat AC. Intra-articular chlamydial antigen and inflammatory arthritis. *Q.J.Med.* 1991;80:575-588.
66. Humphreys GO, Saunders JR, Weston A, Brown MGM. Plasmid transformation of *Escherichia coli*. Transformation. 1978;287-312. Cotswold Press, Oxford.
67. Hygge-Blakeman K, Weintraub A, Widmalm G. Structural determination of the O-antigenic polysaccharide from the enterotoxigenic *Escherichia coli* O147. *Eur.J.Biochem.* 1998;251:534-537.
68. Jiang XM, Neal B, Santiago F, Lee SJ, Romana LK, Reeves PR. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2). *Mol. Microbiol.* 1991;5:695-713.
69. Kaslow RA, Ryder RW, Calin A. Search for Reiter's syndrome after an outbreak of *Shigella sonnei* dysentery. *J.Rheumatology* 1979;6:562-566.
70. Keenleyside WJ, Whitfield C. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J.Biol.Chem.* 1996;271:28581-28592.
71. Kido N, Torgov VI, Sugiyama T, Uchiya K, Sugihara H, Komatsu T, Kato N, Jann K. Expression of the O9 polysaccharide of *Escherichia coli*: Sequencing of the *E. coli* O9 *rfb* gene cluster, characterization of mannosyl transferases, and evidence for an ATP-binding cassette transport system. *J.Bacteriology*

1995;177:2178-2187.

72. Klena JD, Ashford RS2, Schnaitman CA. Role of *Escherichia coli* K-12 rfa genes and the rfp gene of *Shigella dysenteriae* 1 in generation of lipopolysaccharide core heterogeneity and attachment of O antigen. *J.Bacteriology* 1992;174 (22):7297-7307.
73. Kopecko DJ, Washington O, Formal SB. Genetic and physical evidence for plasmid control of *Shigella sonnei* form I cell surface antigen. *Infection and Immunity* 1980;29:207-214.
74. L`vov VL, Dashunin VM, Ramos EL, Shashkov AS, Dmitriev BA, Kochetkov NK. Somatic antigens of *Shigella*: the structure of the polysaccharide chain of *Shigella boydii* type 2 lipopolysaccharide. *Carbohydr.Res.* 1983;124:141-149.
75. L`vov VL, Iakovlev AP, Pluzhnikova GN, Lapina EB, Shashkov AS. Antigenic polysaccharides of bacteria of the genus *Shigella*. The structure of the polysaccharide chain of *Shigella boydii* type 14. *Bioorg.-Khim.(Russian)* 1987;13 (9):1256-1265.
76. L`vov VL, Lapina EB, Belaia OF, Pluzhnikova GN, Shashkov AS. Somatic antigens of *Shigella* and *Escherichia coli*. Determination of the structure of O-specific polysaccharide from *Shigella boydii* type 12 and its serological properties compared with the O-specific polysaccharide from *Escherichia coli*. *Bioorg.-Khim.(Russian)* 1986;12 (9):1240-1252.
77. L`vov VL, Musina LI, Shashkov AS, Ermakov GP, Dmitriev BA. Antigenic polysaccharides of bacteria of the genus *Shigella*. Determination of the structure of polysaccharide chains of *Shigella boydii* type 9 lipopolysaccharide and detection of unusually high molecular weight glycolipid. *Bioorg.-Khim.(Russian)* 1987;13 (9):1245-1255.
78. L`vov VL, Shashkov AS, Dmitriev BA. Antigenic determinants of bacteria. The structure of the repeating unit of a specific polysaccharide from *Shigella boydii* type 7. *Bioorg.-Khim.(Russian)* 1987;13 (2):223-233.
79. L`vov VL, Shashkov AS, Dmitriev BA, Kochetkov NK, Jann K, Jann B. Structural studies of the O-specific side chain of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O:7. *Carbohydr.Res.* 1984;126:259
80. L`vov VL, Shashkov AS, Knirel YA, Arifulina AE, Senchenkova SN, Yakovlev AV, Dmitriev BA. Structure of the O-specific polysaccharide chain of *Shigella boydii* type 5 lipopolysaccharide: a repeated study. *Carbohydr.Res.* 1995;279:183-192.
81. L`vov VL, Tokhtamysheva NV, Shashkov AS, Dmitriev BA, Kochetkov NK. Bacterial antigenic polysaccharides. 12. Structure and <sup>13</sup>C NMR spectrum of the polysaccharide chain of *Shigella boydii* type 8 lipopolysaccharide. *Bioorg.-Khim.(Russian)* 1983;9 (1):60-73.
82. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
83. Lai V, Wang L, Reeves PR. *Escherichia coli* clone *Sonnei* (*Shigella sonnei*) had a chromosomal O-antigen gene cluster prior to gaining its current plasmid-borne O-antigen genes. *J.Bacteriology* 1998;180:2983-2986.
84. Lauhio A, Lahdevirta J, Janes R, Kontiainen S, Repo H. Reactive arthritis associated with *Shigella sonnei* infection. *Arthritis & Rheumatism* 1988;31:1190-1193.
85. LeBrec EH, Schneider H, Magnani TJ, Formal SB. Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J.Bacteriology* 1964;88:1503-1518.
86. Levine MM, DuPont HL, Formal SB. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) dysentery. *J.Infect.Dis.* 1973;127:261-270.
87. Lewin B. Die Expression prokaryotischer Gene. In: Lewin B, ed. *Molekularbiologie der Gene* (Übersetzung

- von Genes IV). 1 Ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1998a:231-346.
88. Lewin B. Die Regulation der Transkription. In: Lewin B, ed. Molekularbiologie der Gene (Übersetzung von Genes IV). 1 Ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1998b:681-710.
  89. Lewin B. Die Transkription. In: Lewin B, ed. Molekularbiologie der Gene (Übersetzung von Genes IV). 1 Ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1998b:240-250.
  90. Lindberg AA, Karnell A, Weintraub A. The Lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor. *Rev.Inf.Dis.* 1991;13 (4):S279-S284
  91. Linnerborg M, Widmalm G, Weintraub A, Albert MJ. Structural elucidation of the O-antigen lipopolysaccharide from two strains of *Plesiomonas shigelloides* that share a type-specific antigen with *Shigella flexneri* spp and *Shigella dysenteriae* 1. *Eur.J.Biochem.* 1995;231 (3):839-844.
  92. Lipkind GM, Kochetkov NK. Theoretical conformation analysis of specific O-antigenic polysaccharides. Polysaccharide of *Shigella dysenteriae* of serotype 2. *Bioorg.-Khim.(Russian)* 1983;9 (11):1568-1577.
  93. Liu D, Cole R, Reeves PR. An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *J.Bacteriology* 1996;178:2107
  94. Lupas A. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* 1996;266:513-525.
  95. MacLachlan PR, Kadam SK, Sanderson KE. Cloning, characterization, and DNA sequence of the rfaLK region for lipopolysaccharide synthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J.Bacteriology* 1991;173:7151-7163.
  96. Macpherson DF, Manning PA, Morona R. Characterization of the dTDP-rhamnose biosynthetic genes encoded in the rfb locus of *Shigella flexneri*. *Mol.Microbiology* 1994;11:292
  97. Macpherson DF, Morona R, Beger DW, Cheah K-C, Manning PA. Genetic analysis of the rfb region of *Shigella flexneri* encoding the Y serotype O-antigen specificity. *Mol.Microbiology* 1991;5:1491-1499.
  98. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol.* 1970;53 (1):159-162.
  99. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Screening expression libraries with antibodies and oligonucleotides. In: Anonymous Molecular cloning, 2nd edition, CSH Press Ed. 1989b
  100. Mathan MM, Mathan VI. Ultrastructural pathology of the rectal mucosa in *Shigella* dysentery. *Am.-J.-Pathol.* 1986;123:25-38.
  101. Mathan MM, Mathan VI. Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis. *Rev.Inf.Dis.* 1991;13:314-318.
  102. Mavris M. Mechanism of bacteriophage SfII-mediated serotype conversion in *Shigella flexneri*. *Mol.Microbiology* 1997;26:939-950.
  103. Mazumder RN, Salam MA, Ali M, Bhattacharya MK. Reactive arthritis associated with *Shigella dysenteriae* type 1 infection. *J.Diarrhoeal Dis.Res.* 1997;15:21-24.
  104. Medzhitov R, Janeway CJr. Innate immunity. *N-Engl-J-Med.* 2000;343 (5):338-344.
  105. Menard R, Sansonetti PJ, Parsot C. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J.Bacteriology* 1993;175:5899-5906.
  106. Menard R, Sansonetti PJ, Parsot C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO Journal* 1994;13:5293-5302.



107. Miller CE, Mulard LA, Padlan EA, Glaudemans CP. Binding of modified fragments of the *Shigella dysenteriae* type 1 O-specific polysaccharide to monoclonal IgM 3707 E9 and docking of the immunodeterminant to its modeled Fv. *Carbohydr.Res.* 1998;309 (3):219-226.
108. Morona R, Daniels C. Analysis of *Shigella flexneri* Wzz (R<sub>ol</sub>) function by mutagenesis and cross linking: Wzz is able to oligomerize. *Mol.Microbiology* 1999;34 (1):181-194.
109. Morona R, Mavris M, Fallarino A, Manning PA. Characterization of the rfc region of *Shigella flexneri*. *J.Bacteriology* 1994;176:733-747.
110. Morona R, van den Bosch L, Daniels C. Evaluation of Wzz/MPA1/MPA2 proteins based on the presence of coiled-coil regions. *Microbiology* 2000;146:1-4.
111. Morona R, Daniels C, Van Den Bosch L. Genetic modulation of *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide O antigen modal chain length reveals that it has been optimized for virulence. *Microbiology*. 2003;149:925-939.
112. Morona R, van den Bosch L, Manning PA. Molecular, Genetic, and Topological Characterization of O-Antigen Chain Length Regulation in *Shigella flexneri*. *J.Bacteriology* 1995;177 (4):1059-1068.
113. Mournier J, Vasselon T, Sansonetti PJ, Hellio R, Lesourd M. *Shigella flexneri* enters human colonic CaCo-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infection and Immunity* 1992;60:237-248.
114. Mutanda LN. A retrospective analysis of the occurrence of *Shigella flexneri* serotypes in some African countries. *East-Afr.-Med.-J.* 1987;64:816-820.
115. Neithercut WD, Hudson MA, Smith CC. Can erythema nodosum and reactive arthritis be a sequel to *Shigella flexneri* gastroenteritis? *Scott.Med.J.* 1984;29:197-199.
116. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996;86:345-348.
117. Noer HR. An experimental epidemic of Reiter's syndrome. *JAMA* 1966;198:693-698.
118. Ogasawara M, Kobayashi S, Hill JL, Kono DH, Yu DT. Rabbit antisera against three different bacteria which can induce reactive arthritides. *Immunology* 1985;54:665-676.
119. Okamura N, Nagai T, Nakaya R, Kondo S, Murakami M, Isatsune K. HeLa cells invasiveness and O antigen of *Shigella flexneri* as separate and prerequisite attributes of virulence to evoke keratoconjunctivitis in guinea pigs. *Infection and Immunity* 1983;39:505-513.
120. Okamura N, Nakaya R. Rough mutant of *Shigella flexneri* 2a that penetrates tissue culture cells but does not evoke keratoconjunctivitis in guinea pigs. *Infection and Immunity* 1977;17:4-8.
121. Ozenberger BA, Nahlik MS, McIntosh MA. Genetic organization of multiple fep genes encoding ferric enterobaktin transport functions in *Escherichia coli*. *J.Bacteriology* 1987;169:3638-3646.
122. Pal J, Basu S, Rao CVN. Immunochemical studies on *Shigella dysenteriae* type 9 bacterial polysaccharide. *Carbohydr.Res.* 1983;114:123-135.
123. Pal J, Rao CVN, Chakraborty AN, Dastidar SG. Immunochemical studies on *Shigella dysenteriae* type 10 bacterial polysaccharide. *Carbohydr.Res.* 1983;122:257-267.
124. Paulsen H, Kutschker W. Synthese von  $\beta$ -L-rhamnosidisch verknüpften Oligosacchariden des Lipopolysaccharides aus *Shigella flexneri* Serotyp 6. *Carbohydr.Res.* 1982;120:25-42.
125. Paulsen IT, Beness AM, Saier MHJr. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology* 1997;143:2685-2699.

126. Payne SM, Hong M. Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol.Microbiology* 1997;24 (4):779-791.
127. Perdomo JJ, Gounon P, Sansonetti PJ. Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *J.Clin.Invest.* 1994;93:633-643.
128. Perdomo JJ, Sansonetti PJ, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J.Exp.Med.* 1994;180:1307-1319.
129. Peterson AA, McGroarty EJ. High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, and *Escherichia coli*. *J.Bacteriology* 1985;162:738-745.
130. Petrovskaya VG, Bondarenko VM. Antigenic variability of *Shigella flexneri* serovars 1-5. *Mol.-Gen.-Mikrobiol.-Virusol.* 1995;2:15-17.
131. Petrovskaya VG, Licheva TA. A provisional chromosome map of *Shigella* and the regions related to pathogenicity. *Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung.* 1982;29:41-53.
132. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282:2085-2088.
133. Porat R, Johns MA, McCabe WR. Selective pressures and lipopolysaccharide subunits as determinants of resistance of clinical isolates of Gram-negative bacilli to human serum. *Infection and Immunity* 1986;55 (2):320-328.
134. Pozsgay V, Batta G, Lipták A, Schneerson R. Conformational stabilization of the altruronic acid residue in the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*/*Plesiomonas shigelloides*. *Carbohydr.Res.* 1997;305:93-99.
135. Rauss K, Kontrohr T, Vertenyi A, Szendrei L. Serological and chemical studies of *Sh. sonnei*, *Pseudomonas shigelloides* and C27 strains. *Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung.* 1970;17 (2):157-166.
136. Raybourne RB, Bunning VK, Williams KM. Reaction of anti-HLA-B monoklonal antibodies with envelope proteins of *Shigella* species. Evidence for molecular mimicry in the spondyloarthropathies. *J.Immunol.* 1988;140:3489-3495.
137. Reeves PR. Evolution of *Salmonella* O-antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. *Trends Genet.* 1993;9:17-22.
138. Reeves PR, Pupo GM, Karaolis DK, Lan R. Evolutionary relationship among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun.* 1997;65 (7):2685-2692.
139. Reeves PR, Franco AV, Liu D. A Wzz (Cld) Protein Determines the Chain Length of K Lipopolysaccharide in *Escherichia coli* O8 and O9 Strains. *J.Bacteriology* 1996;178 (7):1903-1907.
140. Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, Coplin D, Kido N, Klena J, Maskell D, Raetz C, Rick PD. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology* 1996;4 (12):495-503.
141. Reeves PR, Lan R, Lumb B, Ryan D. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 2001;69 (10):6303-6309.
142. Reeves PR, Pupo GM, Lan R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *PNAS* 2000;97 (19):10567-10572.

143. Reeves PR, Wang L, Qu W. Sequence Analysis of Four *Shigella boydii* O-Antigen Loci: Implication for *Escherichia coli* and *Shigella* Relationships. *Infection and Immunity* 2001;69 (11):2923-2930.
144. Réhel N, Szatmari G. Characterization of the Stable Maintenance of the *Shigella flexneri* Plasmid pHS-2. *Plasmid* 1996;36:183-190.
145. Robbins J, Monack D, McCallum S, Vegas A et al. The making of a gradient: IcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiology*. 2001;41 (4):861-872.
146. Robert Koch Institut Berlin. Epidemiologisches Bulletin Nr.29/2002. 19-7-2002. (GENERIC)  
Ref Type: Data File
147. Robert Koch Institut Berlin. Epidemiologisches Bulletin Nr.3/2002. 11-3-2002. (GENERIC)  
Ref Type: Data File
148. Romanowska E, Katzenellenbogen E, Kenne L, Petersson K, Lindberg B. Structural studies of *Shigella flexneri* O-Antigens. *Eur.J.Biochem*. 1978;91:279-284.
149. Rowe B, Groß RJ. Family I. Enterobacteriaceae. In: Holt JG, ed. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994:423-427.
150. Roy N, Mukherjee I, Kumar Das S, Mukherjee A. Synthesis of the tetrasaccharide related to the repeating unit of the antigen from *Shigella dysenteriae* type 5. *Carbohydr.Res*. 2000;325:245-252.
151. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Bacterial strain list. In: Anonymous *Molecular cloning - A laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989a:
152. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Bacteriophage Delta Vectors. In: Anonymous *Molecular cloning - A laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989b:2.57
153. Sandlin RC, Goldberg MB, Maurelli AT. Effect of O-side chain length and composition on the virulence of *Shigella flexneri* 2a. *Mol.Microbiology* 1996;22:63-73.
154. Sandlin RC, Lampel KA, Keasler SP, Goldberg MB, Stolzer AL, Maurelli AT. Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O-antigen for correct unipolar localization of IcsA in the bacterial outer membrane. *Infection and Immunity* 1995;63:229-237.
155. Sansonetti PJ. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol*. 1992;180:1-19.
156. Sansonetti PJ, Arondel J, Cantey JR, Prevost MC, Huerre M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infection and Immunity* 1996;64:2752-2764.
157. Sansonetti PJ, Arondel J, Cavaillon JM, Huerre M. Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J.Clin.Invest*. 1995;96:884-892.
158. Sansonetti PJ, Arondel J, Fontaine A, d'Hauteville H, Bernardini ML. OmpB (osmo-regulation) and icsA (cell-to-cell spread) mutants of *Shigella flexnei*: vaccine candidates and probes to study the pathogenesis of shigellosis. *Vaccine* 1991;9:416-422.
159. Sansonetti PJ, d'Hauteville H, Erabichon C, Pourcel C. Molecular comparison of virulence plasmids in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Ann.Microbiol.(Paris)* 1983;134A:295-318.
160. Sansonetti PJ, Hale TL, Dammin GJ, Kapfer C, Collins HH, Formal SB. Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. *Infection and Immunity* 1983;39 (3):1392-1402.
161. Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*.

Infection and Immunity 1982;35:852-860.

162. Sansonetti PJ, Ménard R, Parsot C. Nonpolar Mutagenesis of the ipa Genes Defines IpaB, IpaC and IpaD as Effectors of *Shigella flexneri* Entry into Epithelial Cells. *J.Bacteriology* 1993;175 (18):5899-5906.
163. Sansonetti PJ, Mournier J, Prevost MC. Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. *Cell* 1994;76:829-839.
164. Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P, Maurelli AT, Mournier J. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infection and Immunity* 1986;51:461-469.
165. Schnaitman CA, Klena JD. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol.Rev.* 1993;57:655-682.
166. Seyffert W. Lehrbuch der Genetik. 2. Auflage 2003. Spektrum Lehrbuch, Gustav Fischer Verlag, ISBN 3-8274-1022-3.
167. Shepherd JG, Wang L, Reeves PR. Comparison of O-antigen gene clusters of *Escherichia coli* (*Shigella*) *Sonnei* and *Plesiomonas shigelloides* O17: *Sonnei* gained its current plasmid-borne O-antigen genes from *P. shigelloides* in a recent event. *Infection and Immunity* 2000;68:6056-6061.
168. Shiga K. Ueber den Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.Erste Abteilung* 1898;24:817-918.
169. Siebenlist U, Simpson RB, Gilbert W. *E. coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters. *Cell* 1980;20:269-281.
170. Sieper J, Braun J, Wu P, Hauer R, Laitko S. The possible role of *Shigella* in sporadic enteric reactive arthritis. *Br.J.Rheumatol.* 1993;32:582-585.
171. Simmons DAR, Romanowska D. Structure and biology of *Shigella flexneri* O-antigens. *J.Med.Microbiol.* 1987;23:289-302.
172. Simon DG, Kaslow RA, Rosenbaum J, Kaye RL, Calin A. Reiter's syndrome following epidemic shigellosis. *J.Rheumatology* 1981;8:969-973.
173. Stenglin S, Habermann P, Uhlmann E, Seed B. Method for preparing fusion proteins. 1994. Patent US 5358857.
174. Stevenson G, Kessler A, Reeves PR. A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. *FEMS Microbiology Letters* 1995;125:23-30.
175. Stevenson G, Neal B, Liu D, Hobbs M, Packer NH, Batley M, Redmond JW, Reeves PR, Lindquist L. Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its rfb gene cluster. *J.Bacteriology* 1994;176 (13):4144-4156.
176. Stieglitz H, Fosmire S, Lipsky P. Bacterial epitopes involved in the induction of reactive arthritis. *Am.J.Med.* 1988;85:56-58.
177. Stieglitz H, Fosmire S, Lipsky P. Identification of a 2-Md Plasmid from *Shigella flexneri* associated with reactive arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1989;32:937-946.
178. Stieglitz H, Lipsky P. Association between reactive arthritis and antecedent infection with *Shigella flexneri* carrying a 2-Md plasmid and encoding an HLA-B27 mimetic epitope. *Arthritis & Rheumatism* 1993;36 (10):1387-1391.
179. Suzuki T, Sasakawa C. Molecular basis of the intracellular spreading of *Shigella*. *Infect Immun.* 2001;69:5959-5966.

180. Takeuchi A, Sprinz H, LaBrec EH, Formal SB. Experimental bacillary dysentery. An electron microscopic study of the response of the intestinal mucosa to bacterial invasion. *Am.-J.-Pathol.* 1965;47:1044
181. Taylor DN, Trofa AC, Sadoff J, Chu C, Bryla D, Shiloach J, Cohen D, Ashkenazi S, Lerman Y, Egan W. Synthesis, characterization, and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella flexneri* type 2a, and *Shigella sonnei* (*Plesiomonas shigelloides*) bound to bacterial toxoids. *Infection and Immunity* 1993;61 (9):3678-3687.
182. Tran Van Nhieu G, Ben Ze'ev A, Sansonetti PJ. Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *EMBO Journal* 1997;16:2717-2729.
183. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 1982;119:115-119.
184. van-Bohemen CG, Nabbe AJ, Dinant HJ. Lack of serologically defined arthritogenic *Shigella flexneri* cell envelope antigens in post-dysenteric arthritis. *Immunol.Lett.* 1986;13:197-201.
185. van-Bohemen CG, Nabbe AJ, Grumet FC. Lack of correlation between HLA-B27 like antigenic epitopes on *Shigella flexneri* and the occurrence of reactive arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* 1986;65:679-682.
186. van-Bohemen CG, Nabbe AJ, Landheer JE. HLA-B27M1M2 and high immune responsiveness to *Shigella flexneri* in post-dysenteric arthritis. *Immunol.Lett.* 1986;13:71-74.
187. van Alphen L, van Kempen-De Troye F, Zanen HC. Characterization of cell envelope proteins and lipopolysaccharides of *Escherichia coli* isolates from patients with neonatal meningitis. *FEMS Microbiology Letters* 1983a;16:261-267.
188. van Alphen L, van Kempen-De Troye F, Zanen HC. Immunological detection of heterogeneous O-antigen containing lipopolysaccharides in *Escherichia coli*. *J.Gen.Microbiol.* 1983b;129:191-198.
189. van den Bosch L, Manning PA, Morona R. Regulation of O-antigen chain length is required for *Shigella flexneri* virulence. *Mol.Microbiology* 1997;23 (4):765-775.
190. Vasselon T, Mournier J, Hellio R, Sansonetti PJ. Movement along aktin filaments of the perijunctional area and de-novo polymerization of cellular aktin are required for *Shigella flexneri* colonization of epithelial Caco-2 cell monolayers. *Infection and Immunity* 1992;60:1031-1040.
191. Verma NK. Molecular characterization of the O-acetyl transferase gene of converting bacteriophage SF6 that adds group antigen 6 to *Shigella flexneri*. *Mol.Microbiology* 1991;5:71-75.
192. Verma NK. Cloning and sequencing of the glucosyl transferase-encoding gene from converting bacteriophage X (SFX) of *Shigella flexneri*. *Gene* 1993;129:99-101.
193. Watarai M, Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C. Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO Journal* 1995;14:2461-2470.
194. Waterman SR, Small PL. Identification of sigma S-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol.Microbiology* 1996;21:925-940.
195. Whitfield C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends in Microbiology* 1995;3 (5):178-185.
196. Whitfield C, Amor PA, Köplin R. Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-cor ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol.Microbiology* 1997;23 (4):629-638.
197. Whitfield C, Heinrichs DE, Fridrich E, Ziebell K, Johnson RP, Amor PA. Distribution of Core Oligosaccharide Types in Lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 2000;68 (3):1116-1124.

198. Whitfield C, Keenleyside WJ, Clarke BR. Structure, function and synthesis of cell surface polysaccharides in *Escherichia coli*. In: Gyles CL, ed. *Escherichia coli in Domestic Animals and Man*. Wallingford: CAB International, 1994:437-494.
199. Whittam TS. *Escherichia and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Washington,DC: Am. Soc. Microbiol., 1996:2708-2720.
200. WHO. Diarrhoeal Disease due to *Shigella*. 2002. World Health Organization. (GENERIC)  
Ref Type: Computer Program
201. Widmalm G, Landersjö C, Weintraub A. Structure determination of the O-antigen polysaccharide from the enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) O143 by component analysis and NMR spectroscopy. *Carbohydr.Res.* 1996;291:209-216.
202. Widmalm G, Linnerborg M, Weintraub A. Structural studies utilizing  $^{13}\text{C}$ -enrichment of the O-antigen polysaccharide from the enterotoxigenic *Escherichia coli* O159 cross-reacting with *Shigella dysenteriae* type 4. *Eur.J.Biochem.* 1999;266:246-251.
203. Yabuuchi E. *Bacillus dysentericus* (sic) 1897 was the first rather than *Bacillus dysenteriae* 1898. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002;52:1041.
204. Yao Z, Valvano MA. Genetic analysis of the O-specific lipopolysaccharide biosynthesis region (rfb) of *Escherichia coli* K-12 W3110: identification of genes that confer group 6 specificity to *Shigella flexneri* serotypes Y and 4a. *J.Bacteriology* 1994;176 (13):4133-4143.
205. Zychlinski A, Fitting C, Sansonetti PJ, Cavaillon JM. Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J.Clin.Invest.* 1994;94:1328-1332.

# ANHANG

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1	PCR-PRODUKT $CLD_{PHS-2}$ .....	79
ABBILDUNG 2	pUC19- $CLD_{PHS-2}$ -OUT IN <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	81
ABBILDUNG 3	pBLUE- $CLD_{PHS-2}$ -OUT, pBLUE- $CLD_{PHS-2}$ -IN UND pUC19- $CLD_{PHS-2}$ -OUT .....	85
ABBILDUNG 4	pBLUE- $CLD_{PHS-2}$ -OUT UND pUC19- $CLD_{PHS-2}$ -OUT IN SF 3A UND 4A .....	86
ABBILDUNG 5	VEKTOR pQE16 IN <i>E. COLI</i> TG1 .....	87
ABBILDUNG 6	pGEX- $CLD_{PHS-2}$ -OUT, pGEX- $CLD_{PHS-2}$ -IN UND pBR322- $CLD_{PHS-2}$ -OUT .....	90
ABBILDUNG 7	KONSTRUKT pUC- $CLD_{PHS-2}^{+27}$ IN SF SEROGRUPPE 6 .....	92
ABBILDUNG 8	KONSTRUKT pUC19- $CLD_{PHS-2}^{+27}$ IN SF SEROGRUPPEN 3A UND 4A .....	92
ABBILDUNG 9	PCR VON PHS-2 MIT DEN OLIGONUKLEOTIDEN 5 UND 6 .....	93
ABBILDUNG 10	KONSTRUKT pUC19- $CLD_{PHS-2}^{+263}$ IN SF SEROGRUPPEN 2A, 4A UND 6 .....	94
ABBILDUNG 11	VERGLEICH DER PROTEINEXPRESSION VON pUC19-KONSTRUKTEN IN <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	96
ABBILDUNG 12	OPTIMIERUNG VON REAKTIONSBEDINGUNGEN BEI DER PROTEINEXPRESSION .....	98
ABBILDUNG 13	EXPRESSION VON $CLD_{PHS-2}$ BEI pUC19-KONSTRUKTEN IN <i>E. COLI</i> FLEXNERI .....	99
ABBILDUNG 14	pBR322- $CLD_{PHS-2}$ -OUT, pGEX- $CLD_{PHS-2}$ -IN UND pGEX- $CLD_{PHS-2}$ -OUT .....	101
ABBILDUNG 15	FUSIONSPROTEIN GST- $CLD_{PHS-2}$ .....	103
ABBILDUNG 16	LPS-MUSTER VON SF SEROGRUPPEN 2A, 4A UND 6 MIT UND OHNE pGEX- $CLD_{PHS-2}$ -IN .....	106
ABBILDUNG 17	LPS-MUSTER VERSCHIEDENER SF SEROGRUPPEN BEI EINEM 12 %IGEN SEPARATIONSSEL .....	107

## Graphisches Verzeichnis

GRAFIK 1	POLYMERISATION VON O-SEITENKETTEN .....	16
GRAFIK 2	<i>rfb</i> -REGION .....	17
GRAFIK 3	LIPOLYDACCCHARIDKETTE VON SF Y .....	19
GRAFIK 4	TETRASACCHARIDEINHEITEN VON <i>E. COLI</i> FLEXNERI .....	21
GRAFIK 5	GLUCOSYLIERUNG .....	22
GRAFIK 6	VERGLEICH VON REPEAT UNITS .....	23
GRAFIK 7	REPEAT UNITS VON <i>E. COLI</i> .....	34
GRAFIK 8	BINDUNGSSTELLEN DER OLIGONUKLEOTIDE AN PHS-2 .....	40
GRAFIK 9	KONSTRUKTE pBLUE- $CLD_{PHS-2}$ -OUT UND pUC19- $CLD_{PHS-2}$ -OUT .....	80
GRAFIK 10	KONSTRUKT pBR322- $CLD_{PHS-2}$ -OUT .....	89
GRAFIK 11	KONSTRUKT pGEX- $CLD_{PHS-2}$ -OUT .....	89
GRAFIK 12	KONSTRUKTE pUC19- $CLD_{PHS-2}^{+27}$ UND pUC19- $CLD_{PHS-2}^{+263}$ .....	95
GRAFIK 13	KONSTRUKT pGEX- $CLD_{PHS-2}$ -IN (6019 BP, MOLEKULARGEWICHT 3,97 x 10 <sup>6</sup> G/L) .....	101

## Hinweistexte

HINWEISTEXT 1	SEQUENZIERREAKTION VON pBLUE- $CLD_{PHS-2}$ -OUT .....	81
HINWEISTEXT 2	SEQUENZIERREAKTION VON pUC19- $CLD_{PHS-2}^{+27}$ .....	93
HINWEISTEXT 3	SEQUENZIERREAKTION VON pUC19- $CLD_{PHS-2}^{+263}$ .....	94
HINWEISTEXT 4	SEQUENZIERREAKTION VON pBLUE- $CLD_{PHS-2}$ -IN .....	101

## Tabellarisches Verzeichnis

TABELLE 1	GENE DER <i>rFB</i> -REGION .....	18
TABELLE 2	NOMENKLATUR VON <i>E. COLI</i> FLEXNERI .....	19
TABELLE 3	CLD- ODER CLD-ÄHNLICHE PROTEINE.....	27
TABELLE 4	BAKTERIENSTÄMME .....	35
TABELLE 5	GERÄTE .....	35
TABELLE 6	CHEMIKALIEN .....	36
TABELLE 7	OLIGONUKLEOTIDE .....	39
TABELLE 8	COMPUTERPROGRAMME .....	75
TABELLE 9	VERGLEICH $\text{CaCl}_2$ - UND $\text{RbCl}$ -KOMPETENTER <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	82
TABELLE 10	VERGLEICH $\text{CaCl}_2$ - UND $\text{RbCl}$ -KOMPETENTER SF SEROGRUPPE 6 (278) .....	82
TABELLE 11	AMPICILLINRESISTENZ VON SF .....	83
TABELLE 12	ÜBERSICHT ÜBER ALLE $\text{CLD}_{\text{pHS-2}}$ -KONSTRUKTE .....	104



## DANKSAGUNG

Diese Doktorarbeit wäre sicher nicht zustande gekommen ohne die Unterstützung vieler hilfreicher Menschen. Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftlich zu arbeiten. Einen speziellen Dank für die fachkundige und technische Unterstützung möchte ich an dieser Stelle allen weiteren Mitarbeitern des Instituts aussprechen, darunter insbesondere Elmira Far, Veronika Gohlke, Stefan Höhne, Moussa Abba, Indre Offermann, Jörg Lang, Hendrik Güthenke. In besonderem Maß danke ich Anke Friedrich für die angenehme Zusammenarbeit und ihre große Geduld bei der Einweisung in den Laborbetrieb.

Mein vorwiegender Dank gilt allerdings PD Dr. Thomas Adam für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit in seinem Labor. Thomas Adam war nicht nur stets für mich erreichbar, sondern unterstützte mich und diese Arbeit auch mit viel Engagement. In zahlreichen Gesprächen ließ er mich an seinem umfassenden Wissen teilhaben und konnte mir so viele weitere Ideen und Anregungen für die Arbeit vermitteln.

Meinen Eltern Hanna und Karl-Heinz Schmidt möchte ich einen besonderen Dank für Ihre dauerhafte Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft aussprechen.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name	Schmidt, Bastian
Geburtsdatum	9. Februar 1975
Geburtsort	Salzgitter

## Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule Kranichdamm, Salzgitter
1985 - 1987	Orientierungsstufe Krähenriede, Salzgitter
1987 - 1994	Kranich Gymnasium, Salzgitter
Juni 1994	Abitur (Note: 2,0)

## Zivildienst

1994 - 1995	Lebenshilfe Salzgitter, Tagesbildungsstätte für geistig behinderte Kinder
-------------	---

## Universitätsbildung

1995 - 2002	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin (Charité) mit Ablegen der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
August 1997	Vorklinisches Examen (Physikum) (Note: 2,6)
August 1998	Erstes Staatsexamen (Note: 2,0)
März 2001	Zweites Staatsexamen (Note: 2,0)
April 2002	Drittes Staatsexamen (Note: 2,0)
2001 - 2002	Praktisches Jahr Innere Medizin im Mayo General Hospital, Castlebar (Irland) und St. Gertrauden-Krankenhaus, Berlin Neurologie in der Charité Campus Virchow, Berlin Chirurgie/Unfallchirurgie/Neurochirurgie im Hospital Reina Sofia., Córdoba (Spanien)

## Berufsausbildung und -weiterbildung

Sep 2002 - Feb 2004	Arzt im Praktikum in der Neurologischen Abteilung des Evangelischen Diakon. Friederikenstift, Hannover, unter der Leitung von Chefarzt Dr. Sipos
Seit März 2004	Assistenzarzt in der Neurologischen Abteilung des Evangelischen Diakon. Friederikenstift, Hannover

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Bastian Schmidt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Veränderungen im LPS-Muster von *E. coli* Shigella durch  $cld_{pHS-2}$   
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die  
(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt  
habe.“

Berlin, den 01.07.2005

Bastian Schmidt